METARHIZIN, EIN ANTIFUNGISCHES ANTIBIOTIKUM AUS METARHIZIUM ANISOPLIAE

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG

DISSERTATION
zur Erlangungung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CHRISTEL GLÜCK geb. Ehmann
aus Reutlingen

1984

METARHIZIN, EIN ANTIFUNGISCHES ANTIBIOTIKUM AUS METARHIZIUM ANISOPLIAE

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG

DISSERTATION
zur Erlangungung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CHRISTEL GLÜCK geb. Ehmann
aus Reutlingen

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1984

Dekan:	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Loeffler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	2
2.1.	Chemikalien	2
2.2.	Nährmedien	4
2.2.1.	Medien für Wachstumsversuche	4
2.2.2.	Spezielle Medien	5
2.2.3.	Medien für Teststämme	5
2.2.4.	Flüssigmedien zur Fermentation	5
2.2.5.	Flüssigmedien für Teststämme (Vorkulturen)	6
2.2.6.	Flüssigmedien für Vergleichsstämme	6
2.3.	Organismen	6
2.3.1.	Produzentenstamm	6
2.3.2.	Teststämme	6
2.3.3.	Vergleichsstämme	8
2.4.	Methoden zur Herstellung von Metarhizin	8
2.4.1.	Fermentation	8
2.4.1.1.	Kulturen im Erlenmeyer-Kolben	8
2.4.1.2.	Fermentation im 10 l-Maßstab	9
2.4.2.	Anreicherung von Metarhizin	9
2.5.	Methoden zur physikalischen und chemischen Charakterisierung	10
2.5.1.	Dünnschichtchromatographie	10
2.5.2.	Stabilitätsuntersuchungen	10
2.5.3.	Nachweisverfahren für Metarhizin	12
2.5.4.	Elektrophorese	12
2.5.5.	Aminosäurenanalyse	13
2.6.	Methoden zur biologischen Charakterisierung	13
2.6.1.	Agardiffusionstest	13
2.6.2.	Strichtest	14

		Seite
2.6.3.	Kreuztest	14
2.6.4.	Bioautographie	14
2.6.5.	Antagonisierungsversuche	14
2.6.5.1.	Test auf Reversibilität der antagonistischen Wirkung	15
2.6.5.2.	Test auf antagonisierende Begleitmetabolite	16
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Der Metarhizin-Produzent	17
3.1.1.	Bestimmung des Stammes Tü 648	20
3.1.1.1.	Wachstum auf Agarmedien	20
3.1.1.2.	Wachstum auf natürlichen Substraten	20
3.1.1.3.	Gattungs- und Artbestimmung	22
3.1.2.	Bedingungen der Metarhizinbildung durch Tü 648	25
3.1.3.	Antibiotikabildung bei verwandten Taxa	26
3.2.	Herstellung von Metarhizin	32
3.2.1.	Fermentation	32
3.2.1.1.	Optimierung	32
3.2.1.2.	Fermentation in Schüttelkulturen	32
3.2.1.3.	Anreicherung	32
3.2.2.	HPLC-Trennungen	38
3.3.	Physikalische und chemische Eigenschaften des Metarhizins	41
3.3.1.	Löslichkeit	41
3.3.2.	Stabilität	41
3.3.3.	Nachweisversuche mit verschiedenen Reagenzien	46
3.3.4.	Elektrophorese	48
3.3.5.	Aminosäurenanalyse	48
3.3.6.	Dünnschichtchromatographische Charakteristika	49

		Seite
3.4.	Biologische Eigenschaften des Metarhizins	50
3.4.1.	Wirkung gegen Pilze	50
3.4.2.	Morphologische Veränderungen an *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125	51
3.4.3.	Antagonismus	51
3.4.3.1.	Reversibilität der antagonistischen Wirkung	52
3.4.3.2.	Antagonisierende Begleitmetabolite	52
4.	DISKUSSION	54
4.1.	Stammbestimmung	54
4.2.	Vergleich mit bekannten *Metarhizium*-Antibiotika	54
4.3.	Aufarbeitungsversuche	56
4.4.	Die Wirkung von Metarhizin	57
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	60

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anregung und Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler am Institut für Biologie II der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie I, ausgeführt.

Für die Überlassung des Themas, Unterstützung und weiterführende Diskussionen danke ich Herrn Professor Dr. Loeffler.

Herrn Professor Dr. G. Jung und Herrn H. Allgaier vom Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen sowie Herrn Professor Dr. H. Kneifel von der KFA Jülich, Institut für Biotechnologie, möchte ich für wertvolle Anregungen und tätige Unterstützung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern im Institut für Mikrobiologie, ganz besonders Frau E. Knorpp und Frau H. Wolter für Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Verwendete Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
BuOH	Butanol
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Berlin, Göttingen
EE	Essigester
EtOH	Ethanol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
KF	Kulturfiltrat
MeOH	Methanol
PSC	Präparative Schichtchromatographie
R_f	ratio of frontiers
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TDM	4,4-Tetramethyldiamino-diphenylmethan
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Tübingen
UV	Ultraviolett

1. E I N L E I T U N G

Aus einer Bodenprobe von einer nordafrikanischen Oase war im mikrobiologischen Großpraktikum der Universität Tübingen im Wintersemester 1971/72 ein zunächst nicht bestimmbarer Pilzstamm - Tü 648 - isoliert und später in einem Screening-Programm auf Antibiotikabildung geprüft worden. Dabei konnte eine selektive Hemmung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Mehrere getestete Stämme anderer Mikroorganismen - Hefen, Fadenpilze und Bakterien - wurden nicht oder nur schwach gehemmt. Ende 1980 wurde Tü 648 als *Metarhizium anisopliae* bestimmt.

Metarhizium anisopliae ist hauptsächlich als insektenpathogene Pilzart bekannt. Die natürliche Bedeutung des Pilzes für die biologische Kontrolle von Insektenpopulationen wird auch experimentell ausgenutzt, beispielsweise bei der Bekämpfung von Schadinsekten wie der Termite *Nasutitermes exitiosus* (Haenel 1981, 1982) und dem Nashornkäfer *Orcytes rhinoceros* (Marschall 1982). Entsprechend zahlreich sind die bei Stämmen von *Metarhizium anisopliae* gefundenen biologisch aktiven, niedermolekularen Stoffwechselprodukte, z.B. Cytochalasine C und D, Destruxine, Helvolsäure, Helvolinsäure, Prolylleucylanhydrid, Prolylvalylanhydrid; antibiotische Wirkungen wurden, von Metarhizin abgesehen, nur für die Antibiotika Helvolsäure und K-582 (Kondo 1980, Kanauchi 1983) festgestellt.

Zwischen den erwähnten, aus der Literatur bekannten Metaboliten und Metarhizin konnten keine Ähnlichkeiten in Bezug auf biologische Wirkungen, physikalische und chemische Eigenschaften festgestellt werden. Es erschien daher lohnend, dieses Engspektrum-Antibiotikum aus *Metarhizium anisopliae* Tü 648 genauer zu charakterisieren, die Bedingungen für seine Produktion zu ermitteln und zu versuchen, die wirksame Substanz anzureichern und, wenn möglich, zu isolieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Die für diese Arbeit benutzten Substanzen und Präparate wurden von den unten verzeichneten Firmen bezogen. Hier nicht aufgeführte Chemikalien stammen von E. Merck, Darmstadt.

Bayer AG Wuppertal/Ebersfeld:
Penicillin G-Na

Bio Rad Laboratories Richmond Calif.:
Bio-Gel P-2

Bischoff Leonberg:
Polygosil-NH_2-Säule für HPLC
Shandon ODS 16 mm Nr. 5111-Säule für HPLC

Brenntag GmbH Mülheim/Ruhr:
Niax Polyol LHT 67

DIFCO Laboratories Detroit Michigan USA:
Bacto Agar; Bacto Corn Meal Agar; Bacto Malt Extract; Bacto Soytone; Bacto Yeast Extract; Bacto Yeast Nitrogen Base; Casamino Acids Vitamine Free; Proteose Peptone

Hedinger Stuttgart:
Hyflo-Supercel (Celite)

Henselwerk Magstadt:
Sojamehl

ICN Pharmaceuticals GmbH + Co. 3440 Eschwege W-Germany:
Aluminiumoxid Woelm neutral Aktivität I

Merck AG Darmstadt:
Cellulose mikrokristallin Avicel zur Säulenchromatographie
DC Alufolien Cellulose F_{254} Schichtdicke 0.1 mm
DC Alufolien Kieselgel 60 F_{254} Schichtdicke 0.2 mm
PSC Fertigplatten Cellulose Schichtdicke 2 mm
PSC Fertigplatten Kieselgel 60 Schichtdicke 2 mm
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 0.036-0.200 mm (70-230 mesh); RP-8 für die Säulenchromatographie (modifiziertes Kieselgel, 15-25 µm, reversed phase)

Oxoid Ltd. London England:
Malt Extract

Pharmacia Fine Chemicals Uppsala Schweden:
Sephadex A-50, G-25, G-50, G-100, LH-20

Serva Feinbiochemica GmbH + Co. Heidelberg:
Anionenaustauscher Dowex 1x8, 50-100 mesh Cl^--Form
Anionenaustauscher Amberlite IRA-904 Cl^--Form

Servachrom Adsorberharze XAD-2, XAD-4, XAD-7

Whatman Chemical Separation Ltd. England:
Fibrous Anion Exchanger DE 23 (Diethylamino Cellulose)

2.2. Nährmedien

2.2.1. Medien für Wachstumsversuche

Corn Meal Agar CMA
17 g Bacto Corn Meal Agar; mit E- Wasser ad 1000 ml; pH 6.0

Hefeagar HA
4 g Hefeextrakt; 10 g Malzextrakt; 4 g Glucose; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 5.5

Hefeagar neutralisiert nHA
Zusätze wie HA; vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 7.3 eingestellt

Hefe-Zucker-Agar HZA
Zusätze wie HA; 200 g Glucose statt 4 g Glucose; pH 5.5

Malzagar MA
20 g Malzextrakt; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 6.0

Sabouraud-Glucose-Agar SGA
10 g Pepton; 40 g Glucose; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 5.5

Sojamehlagar SMA
20 g Sojamehl; 20 g Mannit; 5 g Ammoniumnitrat; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt

2.2.2. Spezielle Medien

Hasenmist; vor dem Autoklavieren mit E-Wasser befeuchtet
Hundekuchen; " " "
Kadaver von *Musca domestica*; " "
Kamelmist; " "

Diesjährige Zweigstücke von Nadel- und Laubhölzern; in Reagenzgläsern mit je 2 ml E-Wasser autoklaviert

2.2.3. Medien für Teststämme

Malzagar MA
20 g Malzextrakt; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 6.0

Yeast Nitrogen Base Agar YNBA
6.7 g Yeast Nitrogen Base; 5 g Glucose; 20 g Agar; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 6.0

2.2.4. Flüssigmedien zur Fermentation

Sojamedium SM
20 g Sojamehl; 20 g Mannit; 2.5 g NH_4NO_3; mit E-Wasser ad 1000 ml; vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt

Sojamedium $_5$ SM_5 (Produktionsmedium)
Zusätze wie SM; 5 g NH_4NO_3 statt 2.5 g NH_4NO_3; pH wie oben eingestellt

2.2.5. Flüssigmedium für Teststämme (Vorkulturen)

Malzmedium MM
20 g Malzextrakt; mit E-Wasser ad 1000 ml; pH 6.0

2.2.6. Flüssigmedien für Vergleichsstämme

Sojamedium SM (Rezeptur unter 2.2.4.)

Sojamedium XM (gleiche Rezeptur wie SM, aber mit entfettetem Sojamehl)

Bei Versuchen zur Optimierung der Antibiotikabildung wurden weitere Nährlösungen getestet. Sie kamen nur einmal zur Verwendung (vgl. 3.1.2.).

2.3. Organismen

Die benutzten Medien sind im Ergebnisteil erwähnt (3.4.1.).

2.3.1. Produzentenstamm
Metarhizium anisopliae Tü 648 (27°C, RT)
Eigenschaften und Herkunft des Produzentenstammes sind im Ergebnisteil unter 3.1. beschrieben.

2.3.2. Teststämme

Bakterien
Bacillus subtilis Cohn ATCC 6051 (37°C)
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici Tü 57

Pilze

Mucorales

Mucor miehei Cooney et Emerson Tü 284 (37°)

Endomycota (Hefen)

Saccharomyces cerevisiae Hansen Tü 125 (27°C)

Saccharomyces cerevisiae Hansen Stamm Neuberg CBS 1256 Tü 539 (27°C)

Saccharomyces cerevisiae Hansen Stamm E 237 Universität Stuttgart-Hohenheim Paarungstyp α Tü 577 (27°C)

Saccharomyces cerevisiae Hansen Stamm A 21 Institut für Gärungsforschung Berlin Paarungstyp a Tü 579 (27°C)

Hansenula wingei Wickerham DSM 70281 Tü 8013 (27°C)

Nadsonia fulvescens (Nadson et Konokotina) Sydow CBS 2596 (Typus) Tü 561 (27°C)

Pichia farinosa Lindner (Hansen) Tü 291 (27°C)

Endomycopsis fibuligera (Lindner) Dekker ATCC 9947 Tü 193 (27°C)

Deuteromycota (den Hefen zugeordnet)

Candida albicans (Robin) Berkhout CBS 562 (Typus) Tü 565 (37°C)

Candida guilliermondii (Castellani) Langerson Tü 8053 CBS 94 (Typus) (27°C)

Candida tropicalis (Castellani) Berkhout Tü 8054 (27°C)

Sonstige Deuteromycota

Alternaria kikuchiana Tanaka Tü 169 (27°C)

Epidermomyces floccosus (Harz) Loeffler CBS 240.67 Tü 576 (27°C)

Fusarium dimerum Penz. var. *nectrioides* Stamm Wollemoeber Tü 570 (27°C)

Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis
ATCC 42899 Tü 282 (27°C)
Paecilomyces variotii Bainier Tü 137 (37°C)

Basidiomycota
Ustilago maydis (Beckmann) Unger CBS 445.63 Tü 567 (27°C)

2.3.3. Vergleichsstämme
Metarhizium anisopliae varietas *anisopliae* CBS 130.71
Tü 8074 (27°C)
Metarhizium anisopliae varietas *anisopliae* CBS 431.67
Tü 8075 (27°C)
Metarhizium anisopliae varietas *anisopliae* CBS 298.67 (27°C)
Metarhizium anisopliae varietas *majus* CBS 248.64 Tü 8076
(27°C)
Metarhizium brunneum CBS 316.51 (27°C)
Metarhizium flavoviride CBS 473.73 Tü 8077 (27°C)
Metarhizium flavoviride CBS 218.56

2.4. Methoden zur Herstellung von Metarhizin

2.4.1. Fermentation
Für Submerskulturen galten folgende allgemeine Bedingungen: Inkubationstemperatur 27°C, Medium SM_5, Produzent *Metarhizium anisopliae* Tü 648. Bei Bedarf in der 10 l-Fermentation Zugabe von 5-15 ml Polyol in ethanolischer Lösung 1:1. Falls nicht anders angegeben, wurde 20 Minuten bei 121°C im Autoklav sterilisiert.

2.4.1.1. Kulturen im Erlenmeyer-Kolben
100 ml SM_5 in 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit seitlichem Einstich wurden mit Konidien von einer SM_5A-Kultur aus dem Schrägröhrchen beimpft. Auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm; Infors AG, Basel, Schweiz) wurde fünf Tage

lang inkubiert. Die Kolbeninhalte wurden entweder aufgearbeitet oder zum Animpfen von Fermentern mit 10 l Nutzinhalt verwendet.

2.4.1.2. Fermentation im 10 l-Maßstab

Der Fermenter (FS-314, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.J., USA) wurde nach dem Sterilisieren (9 l Medium, 134°C, 30 min) mit 1 l Vorkultur beimpft. Zur Zeit, als Fermentationsversuche zur Metarhizinherstellung ausgeführt wurden, kamen Kontaminationen der Fermentationsgefäße durch *Bacillus*-Populationen sehr häufig vor, so daß mit den üblichen Sterilisationsverfahren keine Reinkultur erzielt werden konnte. Doch die Kultur blieb bakterienfrei, wenn je 10 l-Fermenter vor oder bei der Animpfung 100 mg Penicillin-Na in 70%iger ethanolischer Lösung zugegeben wurde. Die Geschwindigkeit des Blattrührers betrug 180 rpm. Belüftet wurde mit 200 l Luft/h. Nach der Beimpfung wurden 5 ml Polyol in ethanolischer Lösung 1:1 pro Fermenter zur Schaumbekämpfung zugesetzt. Bei weiterer starker Schaumentwicklung wurden alle 24 Stunden weitere 5 ml Polyol zugegeben. Nach 4 Tagen war die Kultur erntereif.

2.4.2. Anreicherung von Metarhizin

Die gesamte biologische Aktivität ist im Kulturfiltrat nachweisbar. Es wird durch Filtration vom antibiotisch inaktiven Myzel getrennt.
Um Verluste möglichst niedrig zu halten, werden die weiteren Schritte im Batch-Verfahren durchgeführt. Unter 3.2.2.3. sind die Techniken genauer beschrieben.

Die weitere Aufarbeitung beginnt mit Adsorption an den Anionenaustauscher DE-23 und Desorption mit essigsaurem 0.4 molarem Ammoniumacetat pH 6.0. Das Eluat wird eingeengt. Mit Ethanol wird der aktive Anteil ausgefällt und in 70% Etha-

nol gelöst. Inaktive unlösliche Begleitstoffe werden abfiltriert. Nach Einengen wird die Aktivität an den Anionenaustauscher IRA-904 adsorbiert und mit 1 molarem Ammoniumacetat pH 6.0 desorbiert. Das Eluat wird eingeengt. Man fällt den aktiven Anteil mit Ethanol aus, löst das Präzipitat in 70% Ethanol, entfernt unlösliche Begleitmetabolite durch Filtration und engt die Lösung ein. An XAD-7 lassen sich weitere inaktive Begleitstoffe adsorbieren. Der antibiotisch aktive Überstand wird lyophilisiert. Über HPLC wird die Endreinigung durchgeführt.

2.5. Methoden zur physikalischen und chemischen Charakterisierungerung

2.5.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Stahl 1967) diente der Identifizierung und Reinheitsprüfung von Metarhizin. Es wurden fertige Kieselgel-Alufolien F_{254} verwendet. Als bestes Fließmittel erwies sich ein Gemisch aus 7 Teilen Ethanol absolut und 3 Teilen Wasser. Im Ergebnisteil sind unter 3.3.6. weitere Fließmittel und die dazugehörigen R_f-Werte angegeben.

2.5.2. Stabilitätsuntersuchungen

Temperaturstabilität

Wäßrige Lösungen von Präparat D (s. 3.2.1.3.) wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml Temperaturen von 80°C und 100°C im Wasserbad ausgesetzt. In zehnminütigen Abständen wurden jeweils 10 µl der erhitzten Präparate auf Filterplättchen appliziert und im Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität untersucht.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration
Es wurde die Stabilität zwischen pH 1 und pH 10 untersucht. Dazu wurden 10 mg des lyophilisierten Präparats D in 10 Portionen zu je 1 mg aufgeteilt und in 1 N HCl, E-Wasser und 1 N NaOH gelöst. Die ganzzahligen pH-Werte wurden entsprechend mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt. Nach fünf Minuten Einwirkungszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 1 N NaOH und 1 N HCl neutralisiert. Entsprechende Aliquote der Lösungen wurden auf Filterrondellen aufgetragen, so daß jeweils 10 µg des eingesetzten Präparats D im Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität untersucht werden konnte.

Stabilität gegenüber ultravioletter Strahlung
12 Filterrondellen wurden mit je 10 µg von Präparat D in wäßriger Lösung beschickt und mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Alle 10 Minuten wurde eine Rondelle aus dem Bereich der Strahlungsquelle genommen und im Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität untersucht.

Oxidationsversuch
2 ml einer Lösung von 1 mg/ml des Präparats D wurden mit 0.5 ml H_2O_2 in 30%iger wäßriger Lösung versetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach zwei Stunden wurde diese Mischung im Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität in einer Konzentration von 10 µg Metarhizin pro Filterrondelle untersucht. Die Rondellen mußten vorher 30 Minuten lang an der Luft getrocknet werden, damit überschüssiges H_2O_2 verdunstete. Nach 24 Stunden Verweilzeit bei Raumtemperatur wurde noch eine Probe genommen und auf die gleiche Weise untersucht.

2.5.3. Nachweisverfahren für Metarhizin

- Bioautographie auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125: Dünnschichtchromatogramme von Metarhizin auf Alu-Folien wurden nach dem Trocknen in passende Stücke zerschnitten und 5 Minuten lang auf Tü 125-Testplatten gelegt. Anschließend wurden die Testplatten 24 Stunden lang bei 27°C inkubiert. Anhand der Lage der Hemmzone konnten die entsprechenden R_f-Werte von Metarhizin für verschiedene Chromatographiesysteme ermittelt werden.
- Fluoreszenzlöschung der Substanzflecken auf der Dünnschichtplatte im UV-Licht bei 366 nm.
- Besprühen der Dünnschichtplatte mit Ninhydrin-Sprühreagenz, TDM-Reagenz oder Vanillin-Schwefelsäure.

2.5.4. Elektrophorese

Auf einem Gerät der Firma Serva GmbH + Co. Heidelberg wurde mit Citrat- und Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten die Papierelektrophorese durchgeführt.

- Dinatriumcitrat 0.1 M, HCl 0.1 M:
pH 3.0; 3.2; 3.3; 3.5; 3.7; 4.0; 4.2; 4.5; 4.7; 4.8
- Monokaliumphosphat 0.1 M, Dinatriumphosphat 1/15 M:
pH 4.8; 5.2; 6.2; 6.8; 6.95

Auf puffergetränkte Filterpapierstreifen (Elektrophoresepapier MN 261 von Macherey + Nagel Düren) von 5 cm Breite wurden in der Mitte 10 µg Präparat D in wäßriger Lösung punktförmig aufgetragen. Die Elektrophorese lief jeweils eine Stunde bei 200 V. Nach dem Lauf wurden die Papierstreifen in passende Stücke zerschnitten und mit Hilfe des Agardiffusionstests auf die Lage der antibiotischen Aktivität untersucht. Das Besprühen der Papierstreifen mit Ninhydrin-Sprühreagenz diente zur Überprüfung der Trennwirkung.

2.5.5. Aminosäurenanalyse *
0.5 mg der vereinigten Fraktionen 2 und 3 wurden in 500 µl 6 N HCl gelöst und 18 Stunden in einer zugeschmolzenen Glasampulle hydrolysiert. Nach dem Eindampfen am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 1 ml Natriumcitratpuffer pH 2.2 gelöst und 100 µl davon zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in den automatischen BIOTRONIC AMINOSÄUREANALYSATOR LC 600 E eingespritzt.

2.6. Methoden zur biologischen Charakterisierung

2.6.1. Agardiffusionstest
Der Test diente zum Nachweis von Metarhizin. Er wurde nach Zähner und Maas (1972) in Petrischalen der Firma Greiner, Nürtingen mit Filterrondellen von 6 mm Durchmesser (Macherey + Nagel, Düren) durchgeführt.

Herstellung von Testplatten mit Hefen
Die Testkeime wurden in Malzmedium bei 27°C und 120 rpm auf der rotierenden Schüttelmaschine 24 Stunden lang angezogen. Größere Zellaggregationen entfernte man durch Filtration über Glaswatte. Zu 100 ml flüssigem Keimschichtagar kamen je 4 ml dieser Vorkultur. Grundschicht: 10 ml, Keimschicht: 5 ml. Die fertigen Testplatten konnten bei +2°C 14 Tage lang aufbewahrt werden.

Herstellung von Testplatten mit Pilzen und Streptomyceten
Die Sporen wurden vom Schrägagarröhrchen mit je 5 ml steriler Na-Laurylsulfatlösung (100 mg/l) abgeschwemmt, wie oben filtriert und in Testplatten eingegossen, die bei +2°C 7 Tage lang aufbewahrt werden konnten.

---

* Für diese Analysen danke ich Frau M. Munari, Tübingen

2.6.2. Strichtest

Der Strichtest wurde mit Hefen durchgeführt und diente zur Untersuchung des Wirkungsspektrums von Metarhizin. In die Mitte einer Malzagarplatte wurde eine Filterrondelle gelegt, die mit 10 µg von Präparat D in wäßriger Lösung beschickt und getrocknet worden war. Mit der Impföse wurden die zu testenden Hefestämme von der Rondelle ausgehend auf die Platte aufgetragen. Inkubationsbedingungen: 24 h, 27°C. Es konnten gleichzeitig 6 verschiedene Stämme auf einer Platte getestet werden.

2.6.3. Kreuztest

Die Durchführung des Kreuztests ist bei Zähner und Maas (1972) beschrieben. Er diente dazu, antagonistische Effekte zu charakterisieren.

2.6.4. Bioautographie

Das Verfahren wurde unter 2.5.3. beschrieben.

2.6.5. Antagonisierungsversuche

Von folgenden Substanzen wurden 0.1 M wäßrige Lösungen hergestellt:

1) Aminosäuren:

a) Aminosäuren mit Kohlenwasserstoff-Seitenkette:
   Glycin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin

b) Aminosäuren mit nichtionisierten, polaren Gruppen:
   Allothreonin, Asparagin, Cystein, Glutamin, Methionin, Serin, Tryptophan, Tyrosin

c) Saure Aminosäuren:
   Asparaginsäure, Glutaminsäure

d) Basische Aminosäuren:
   Lysin

2) Kohlenhydrate:
Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Maltose, Mannose, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, lösliche Stärke

Aminosäurenhaltige Substanzen (Casamino Acids, Hefeextrakt, Pepton aus Casein, Proteose Pepton) wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml in Wasser gelöst, ebenso Ammoniumacetat.

Filterpapierplättchen wurden mit 10 µl einer Lösung von Präparat D in einer Konzentration von 1 mg/ml beschickt. Nach dem Trocknen wurden sie mit je 0.5 µMol, 1 µMol und 2 µMol der entsprechenden Chemikalien in wäßriger Lösung präpariert, bei den aminosäurenhaltigen Substanzen und Ammoniumacetat jeweils 10 µg, 20 µg und 40 µg. Im Agardiffusionstest gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 wurde untersucht, welche Substanzen gegen Metarhizin antagonistisch wirken.

2.6.5.1. Test auf Reversibilität der antagonistischen Wirkung

Auf eine DC-Alufolie Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator wurde am Start eine Reihen von Punkten den Präparats D aufgetragen (je 10 µg in wäßriger Lösung). Darauf kamen nach dem Trocknen der Flecken die entsprechenden Mengen der antagonisierenden Substanzen (vgl. 3.4.3.1.), ebenfalls in wäßriger Lösung. Die Platte wurde mit Ethanol/Wasser 7/3 chromatographiert. Durch Betrachtung der Platte unter UV-Licht (366 nm) und im Bioautogrammtest gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 wurde beurteilt, ob sich Metarhizin und antagonisierende Substanzen trennen lassen. In derselben Weise präparierte Kieselgel-DC-Folien wurden mit Fließmitteln zur Trennung von Aminosäuren nach Stahl (1967) chromatographiert und genauso auf Trennung der Komponenten getestet. Zum Vergleich wurden Chromatogramme der Antagonisten ohne Metarhizin unter denselben Bedingungen gemacht.

Verwendete Fließmittel (n. Stahl 1967):
Benzol:Pyridin:Eisessig 80:20:2
Chloroform:Methanol:Eisessig 95:5:2
Die Chromatogramme der Antagonisten ohne Metarhizin wurden durch Besprühen mit Ninhydrin Sprühreagenz und Betrachtung unter UV-Licht beurteilt.

2.6.5.2. Test auf antagonisierende Begleitmetabolite

10 ml Kulturfiltrat wurden lyophilisiert und nacheinander in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml Wasser aufgenommen, wobei jedesmal 10 µl der Lösungen im Agardiffusionstest gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 auf antibiotische Aktivität untersucht wurden. Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen dieser Testserie lassen auf Antagonismus bzw. Synergismus schließen.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Der Metarhizin-Produzent

Stamm Tü 648, der sich später als einziger Produzent des Antibiotikums Metarhizin erweisen sollte, wuchs nach der Isolierung aus nordafrikanischem Oasenboden in den ersten Passagen auf Hefeagar mit hyalinen, sich rasch ausbreitenden Hyphen, die manchmal zu Hyphenbündeln (Synnemata) vereinigt waren und einen roten, rasch ins Agarmedium diffundierenden Farbstoff ausschieden. In manchen Subkulturen entwickelten sich nach einigen Tagen kurze Ketten von Konidien an Phialiden, die zunächst regellos auf Einzelhyphen und Synnemata verteilt erschienen. In größeren Massen zeigten die Konidien eine gelbgrüne bis olivbraune Färbung. Bisweilen entstanden die konidienbildenden Phialiden an komplexeren Trägerorganen - Koremien (fruktifizierende, vom Substrat aufragende Hyphenbündel) oder Sporodochien (Fruchtpolster der Konidienfruktifikation) -, seltener an unmittelbar am Substratmyzel inserierten, wie bei *Penicillium* verzweigten Konidiophoren (Abb. 1 u. 2).

Die morphologischen Merkmale des Stammes waren zunächst nicht stabil. Häufig fiel die Konidienbilding aus, manchmal auch die antibiotische Aktivität (Prof. Loeffler, persönl. Mitteilung). Gut und regelmäßig sporulierende Kolonien des Pilzes wurden für Subkulturen ausgewählt. Sojamehlagar erwies sich als besonders sporulationsfördernd und bestgeeignet für die Stammhaltung, und so konnten später durch Abschwemmen und Lyophilisieren von Konidien Keimkonserven hergestellt werden. Deren Folgekulturen erwiesen sich auch nach zahlreichen Passagen bezüglich Konidienbildung und Antibiotikaproduktion als stabil und lieferten reproduzierbare Ergebnisse.

Abb. 1

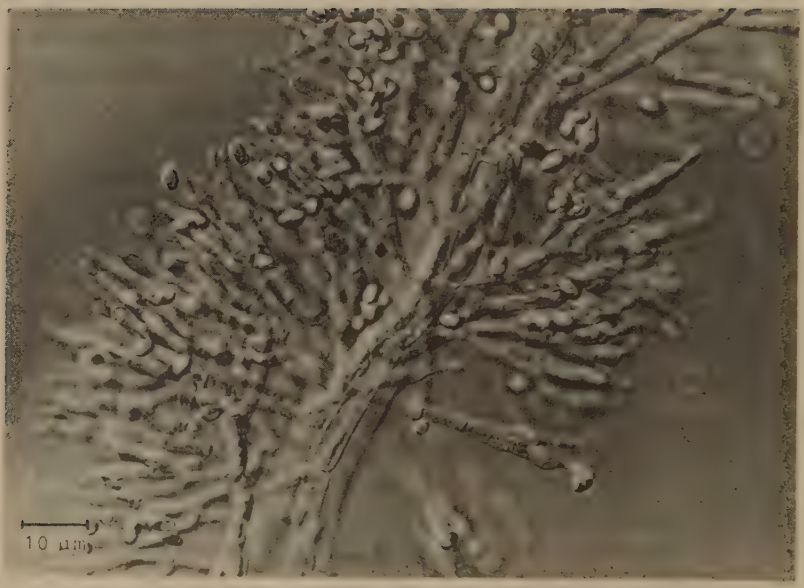


Abb. 2

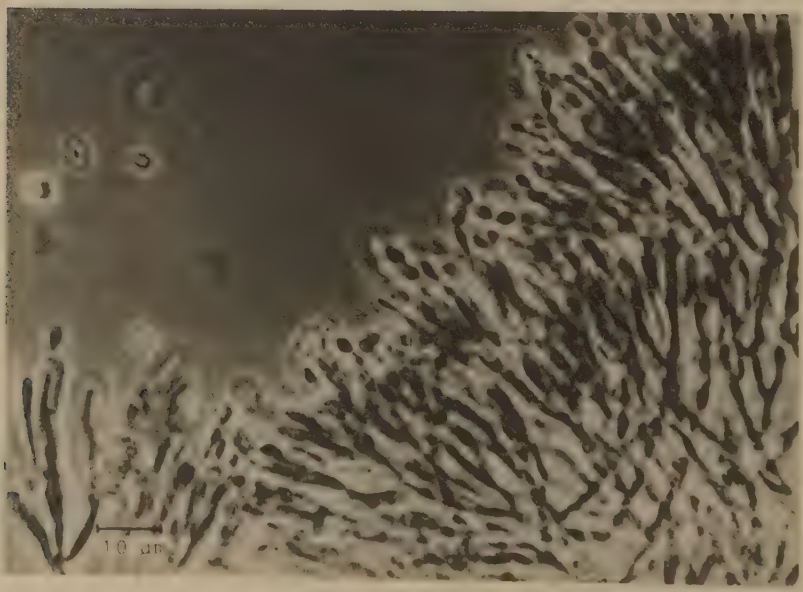


Abb. 3

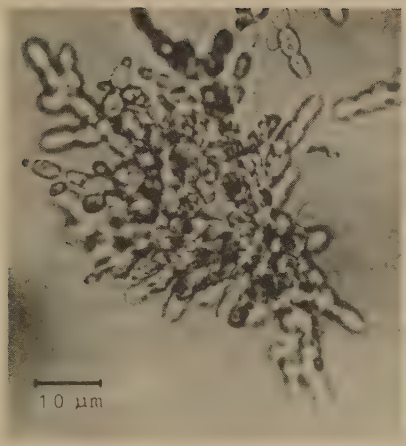


Abb. 4

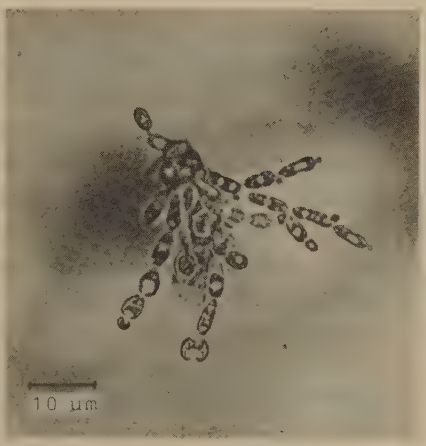


Abb. 1 *Metarhizium anisopliae* Tü 648 Koremium mit Konidien
5 Tage lang auf SMA_5 bei RT kultiviert.
(Interferenzphasenkontrast)

Abb. 2 *Metarhizium anisopliae* Tü 648 Sporodochium mit Konidien
Gleiche Kulturbedingungen.
(Phasenkontrast)

Abb. 3 *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 normal entwickelte Kultur
24 Stunden lang auf YNBA bei 27°C kultiviert.
(Phasenkontrast)

Abb. 4 *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 Kultur unter Metarhizin-Einfluß (Hemmhof einer Filterrondelle mit 10 µg von Präparat D)
24 Stunden lang auf YNBA bei 27°C kultiviert.
(Phasenkontrast)

3.1.1. Bestimmung des Stammes Tü 648

Zur Bestimmung des Antibiotikaproduzenten mußte zunächst ermittelt werden, unter welchen Bedingungen der Stamm die wichtigsten Merkmale zuverlässig und in typischer Form ausbildet. Dazu wurden einerseits Agarmedien, andererseits natürliche Substrate als Nährböden verwendet. An den Kulturen wurden dann - in der Regel nach siebentägiger Inkubation bei 27°C - Wuchsformen und Fruktifikationsorgane untersucht. Möglichst verschiedenartige Substrate waren auch verwendet worden, um die Chance zu vergrößern, die von Schaerfenberg (1959) beschriebene Hauptfruchtform wiederzufinden.

3.1.1.1. Wachstum auf Agarmedien

Tü 648 reagiert sehr deutlich auf Unterschiede in den Kulturbedingungen(Tab.1). Die reichverzweigten Konidienträger vom *Penicillium*-Typ fanden sich hauptsächlich auf Sojamehl-Agar, während Koremien (Abb.2), seltener auch Sporodochien, bevorzugt auf den übrigen Substraten gebildet wurden. Von einer Ausnahme abgesehen (Hefeagar mit zehnfachem Glucosegehalt), kommt antibiotische Aktivität in denselben Nährbodentypen vor, die auch eine gute Sporulation ermöglichen.

3.1.1.2. Wachstum auf natürlichen Substraten

Wachstum auf Zweigstücken

Diesjährige, etwa sieben Zentimeter lange Zweigstücke verschiedener Gehölze waren mit je 2 ml entmineralisiertem Wasser in watteverschlossenen Reagenzgläsern autoklaviert und in einer parallel angesetzten Versuchsreihe außerdem vor dem Sterilisieren tiefgefroren worden. Die Zweigstücke wurden dann auf der ganzen Länge mit Konidien von Tü 648 beimpft und eine Woche lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 1 Entwicklung von *Metarhizium anisopliae* Tü 648 auf verschiedenen Agarmedien (27°C, 7 Tage)

Nähr-medium *]	Wachstum	Substratmyzel		Diffundierender Farbstoff	Konidien		Antibiotische Aktivität
		Hauptstruktur	Farbe		Menge	Entstehung	
MA	+	Synnemata	weiß bis rosa	rot	(+)	an Koremien	-
SMA_5	++	Einzelhyphen	weiß	rot bis rotbraun	+++	an verzweigten Einzelträgern	+
HA	++	Synnemata	rosa bis rot	rot	+++	an Koremien und Sporodochien	+
CMA	+	Einzelhyphen	weiß bis gelb	-	-	-	-
HZA	++	Synnemata	rosa bis rot	rot	+++	an Koremien und Sporodochien	+
SGA	++	Synnemata	rosa bis rot	rot	+++	an Koremien und Sporodochien	+

*] s. 2.2.1.

Tabelle 2 zeigt, daß sich der Pilz in der Regel auf den nur autoklavierten Zweigen besser entwickelt. Auf den zusätzlich frostgeschädigten Zweigen sind schwächeres Wachstum und Ausbleiben der Sporulation festzustellen.

Wachstum auf anderen natürlichen Substraten
Weitere Substrate wurden, mit entmineralisiertem Wasser befeuchtet, in Glaspetrischalen sterilisiert, mit Konidien beimpft und bei 27°C mehrere Wochen lang inkubiert und beobachtet.
Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß dabei die gleichen Typen vegetativer und fruktifikativer Pilzorgane wie auf Agarmedien (Tab.1) und sterilisierten Zweigen (Tab.2) entstanden; im Gegensatz zu den Erfahrungen mit Agarnährböden konnten Verfärbungen der Substrate hier nicht festgestellt werden. Es ist nicht gelungen, auf diesen und sämtlichen anderen benutzten Medien auch nur die Andeutung einer sexuellen Fruktifikation zu entdecken.

3.1.1.3. Gattungs- und Artbestimmung

Die Bestimmung des Pilzes führte zur Gattung *Metarhizium* Sorokin. Innerhalb des Genus kamen hauptsächlich zwei Arten in Frage, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin und *Metarhizium flavoviride* Gams et Rozsypal; die Typusart *Metarhizium anisopliae* existiert in zwei Varianten: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* und *Metarhizium anisopliae* var. *majus* (Johnston) Tulloch. Authentische Stämme der erwähnten Taxa wurden mit Tü 648 verglichen (Tab.4).

Tü 648 paßt am besten in die Typusvarietät von *Metarhizium anisopliae*. Zu den übrigen Taxa bestehen größere Unterschiede. Allerdings entspricht die Form der Konidien eher *Metarhizium flavoviride*. Bei der Bewertung der Merkmale wurde

Tabelle 2 Entwicklung von Tü 648 auf Zweigstücken verschiedener Gehölze

Pflanzenart	Pilzentwicklung			
	auf autoklavierten Zweigen			auf frostgeschädigten und autoklavierten Zweigen
	Wachstum	Konidien	Koremien	
Corylus avellanea	++	-	-	kein Wachstum
Fagus silvatica	+	+	+	wenig Myzel, steril
Ligustrum vulgare	-	-	-	wenig Myzel, steril
Pinus silvestris	(+)	-	-	wenig Myzel, steril
Prunus domestica	+	+	+	wenig Myzel, steril
Pyrus communis	-	-	-	wenig Myzel, steril
Quercus robur	+	+	+	wenig Myzel, steril
Rosa canina	+	+	+	wenig Myzel, steril
Spiraea salicifolia	+	(+)	+	kein Wachstum
Tilia cordata	+	+	+	wenig Myzel mit Konidien

Zeichenerklärung s. Tab.3

Tabelle 3 Entwicklung von Tü 648 auf natürlichen Substraten

Substrat	Wachstum	Konidienbildung
Zweige von Nadel- und Laubgehölzen	+ meist Synnemata	(+) an Koremien
Musca domestica, Kadaver	(+)	(+) an Hyphen
Kamelmist	+	++ auf Sporodochien
Hasenmist, Hundekuchen	+	++ auf Sporodochien

Zeichenerklärung zu Tab.2 und 3

Intensitätsstufen: (+) = schwach, + = mittel, ++ = stark

Tabelle 4 Vergleich von Tü 648 mit *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* und *Metarhizium flavoviride*

Maße, Eigenschaften	*Metarhizium anisopliae* var. *majus*	v. *anisopliae*	Tü 648	*Metarhizium flavoviride* junge Kultur	alte Kultur
Phialiden	10-14 x 2.5-4 µm *	8-20 x 3-4 µm **	10-17 x 1.5-2 µm **	9-14 x 3-4.5 µm ***	9-14 x 2-3 µm ***
	10-18 x 2-3 µm **			8-14 x 2.5-3.5 µm **	8-14 x 2-3 µm **
Konidien	7-16 x 2.5-3.5µm *	3.5 x 2.3 µm *	4-5 x 2-3 µm **	7-9 x 4.5-5.5 µm ***	7-10 x 3-4 µm ***
	8-12 x 2.5-3.5µm *	4-6 x 2-3 µm **		8-12 x 3-5 µm ***	10-12 x 3-5 µm ***
Konidienfarbe	dunkelgrün bis sepiabraun		beige bis oliv	gelbgrün bis oliv	
Konidienform	zylindrisch, an den Enden abgerundet		oval	oval	

Zeichenerklärung: * Angaben nach Tulloch 1976 (Kultur auf Reis und Potato Dextrose Agar, 27°C)

** Selbstermittelte Ergebnisse (Kultur auf SMA_5, 27°C)

*** Angaben nach Gams und Rozsypal 1973 (Kultur auf Oatmeal Agar und Malzagar, 27°C)

die Ähnlichkeit mit *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* höher eingeschätzt und der minimen Abweichung kein ausschlaggebendes Gewicht beigemessen. Insgesamt scheinen sämtliche Stämme der Gattung *Metarhizium* viele Gemeinsamkeiten aufzuweisen, und man könnte von einem Artenkomplex sprechen, bei dem für manche Merkmale keine Grenzen zwischen den einander sehr ähnlichen Species zu bestehen scheinen. Die Variabilität betrifft Konidienfarbe, -form und -größe, Farbstoffbildung und makroskopische Merkmale der Agarkulturen. Eher konstant erscheinen die Dimensionen der Phialiden und die Fruktifikationstypen (verzweigte Konidienträger eines bestimmten Musters, Anordnung der Verzweigungen). Das Auftreten von Koremien und Sporodochien dürfte eher zu den Eigenschaften bestimmter Stämme gehören und zur Abgrenzung von Species nur bedingt herangezogen werden.

Tü 648 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* bildet die reichverzweigten, charakteristischen Konidienträger hauptsächlich auf Sojamehl-Agar.Die auch in der Spezialliteratur (z.B. Tulloch 1976, Gams u. Rozsypal 1973) seltener erwähnten Koremien und Sporodochien wurden auf verschiedenen anderen Substraten, aber nur ausnahmsweise und in atypischer Form auf Sojamehl-Agar ausgebildet. Interessant erscheint die Entstehung von Sporodochien auf nicht-holzigem, nährstoffreichem Material (vgl. Tab.1). Werden Koremien und Sporodochien auf dem gleichen Agarmedium gebildet, so erscheinen sie zeitlich nacheinander in dieser Reihenfolge.

3.1.2. Bedingungen der Metarhizinbildung durch Tü 648

Die den Stamm Tü 648 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* auszeichnende Hemmwirkung auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 wird auf ein "Metarhizin" genanntes Antibiotikum zurückgeführt. Es war damit zu rechnen, daß äußere Bedingun-

gen die Hemmstoffproduktion ebenso stark beeinflussen, wie dies für die Morphologie von Tü 648 beobachtet worden war (vgl. Tab.1). Deshalb wurden Wachstum und Antibiotikabildung des Stammes in verschiedenen Nährlösungen geprüft (Tab.5).

Die in Tabelle 5 wiedergegebenen Ergebnisse entsprechen den Erwartungen. Wie auf Agarmedien (3.1.1.1.), so hängt auch in flüssigen Kulturen des Pilzes die Antibiotikabildung vom Vorhandensein wachstumsfördernder Nährstoffe ab. Weniger reiche Medien zeigen geringere Antibiotikaproduktion. Eine Verdoppelung des Stickstoffzusatzes führt zudem zu dreifacher Metarhizin-Konzentration bei Kulturen in Sojamedium.

Außer den erreichten Metarhizin-Konzentrationen (Hemmhofgrößen) ist für die weiteren Versuche auch wichtig, wie gut sich die Resultate reproduzieren lassen und wie lange das Metarhizin-Niveau im jeweiligen Medium erhalten bleibt. Je kleiner die Hemmhöfe waren, desto weniger lange hielt der Antibiotikagehalt an.

3.1.3. Antibiotikabildung bei verwandten Taxa

Es bestand die Möglichkeit, daß andere Stämme der Species *Metarhizium anisopliae* und ihrer Verwandten dasselbe Antibiotikum oder metarhizin-ähnliche Hemmstoffe bilden. Für ein Screening in diesem Verwandtschaftsbereich mußte die Abhängigkeit der in Frage kommenden Stämme von den Außenbedingungen berücksichtigt werden. Darum wurden sowohl Agar- als auch Flüssigmedien zur Anzucht verwendet, und die Kulturen mußten im Verlauf der Inkubation mehrmals getestet werden. Aus den festen Medien wurden mit dem Korkbohrer Agarzylinder ausgestochen und im Plattendiffusionstest auf antibiotische Aktivität untersucht. Die Flüssigkulturen wurden wie gewöhnlich mit Filterplättchen getestet (Tab.6).

Tabelle 5 Wachstum und Antibiotikabildung von Stamm Tü 648 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in verschiedenen Nährlösungen[1]

Nährmedium (Zahlen = Medienkomponenten in Gramm pro Liter)	Wachstum[2]	antibiotische Aktivität[3]
Chemisch definiertes Medium I (CDM I): 5 g Ammoniumtartrat; 1 g KH_2PO_4; 0.4 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0.01 g NaCl; 0.01 g $CaCl \cdot 6 H_2O$; 20 g Saccharose in 200 ml E-Wasser extra autoklaviert; 1 ml Pridham and Gottlieb's Trace Salts Solution (Shirling u. Gottlieb 1964[4]); mit E-Wasser ad 1000 ml	+	9
Chemisch definiertes Medium II (CDM II): 3 g KH_2PO_4; 7 g K_2HPO_4; 0.5 g Na-Citrat; 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 1 g $(NH_4)_2SO_4$; 2 g Glucose in 200 ml E-Wasser extra autoklaviert; mit E-Wasser ad 1000 ml	+	15
Sideramin-Produktionsmedium (SPM; Anke 1972): 20 g Glucose; 5.68 g L-Asparagin·7 H_2O; 1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 1 g K_2HPO_4; 0.5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; mit E-Wasser ad 1000 ml	-	-
SPM mit 0.5 g/l Hefeextrakt	+	-
Sabouraud-Glucose-Medium(SGM): 10 g Pepton; 40 g Glucose	+	12
Neutralisiertes Oxoid-Malzextrakt-Medium (nMMO): 20 g Oxoid-Malzextrakt; mit E-Wasser ad 1000 ml; vor dem Autoklavieren mit 1 N NaOH auf pH 7.4 eingestellt	+	19

Tabelle 5 (Fortsetzung) Nährmedium	Wachstum [2]	antibiotische Aktivität [3]
MMO: Wie nMMO, jedoch pH vor dem Autoklavieren nicht eingestellt	+	12
nMMD: Wie nMMO, jedoch Malzextrakt DIFCO Bacto benutzt	+	-
MMD: Wie MMO, jedoch Malzextrakt DIFCO Bacto benutzt	+	-
Soja-Medium SM (s. 2.2.4.)	+++	20
Soja-Medium$_5$ SM$_5$ (s. 2.2.4.)	+++	28
Soytone-Soja-Medium SSM: Wie SM$_5$, jedoch Soytone DIFCO Bacto statt Sojamehl	+	-

---

[1] Schüttelkulturen, Inkubationstemperatur 27°C, Inkubationszeit 5 Tage

[2] Wachstum +++ = stark, + = schwach

[3] Hemmwirkung auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125, Zahlen = Hemmhofdurchmesser in mm

[4] Pridham and Gottlieb's Trace Salts Solution: 0.64 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.11 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0.79 g $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$; 0.15 g $ZnSO_4 : 7\ H_2O$; mit E-Wasser ad 100 ml

Tabelle 6 Antibiotische Aktivität verschiedener *Metarhizium*-Stämme bei Kultivierung in flüssigen Medien und auf Agarnährböden

Zeichenerklärung:

Nährmedien: (A) = Hefeagar; (B) = $Sojamehl_5$-Agar; (C) = Sojamehl-Medium mit entfettetem Sojamehl; (D) = Sojamehl-Medium. Zusammensetzung der Medien unter 2.2.3.

Antibiotische Aktivität: ⊕ = Hemmhof scharf begrenzt, Hemmung vollständig; + = Hemmung partiell (Hemmhof leicht bewachsen oder/und Hemmhofgrenze unscharf; - = keine Hemmwirkung festgestellt

Test-system	Tü 648	*Metarhizium anisopliae* varietas								*Metarhizium flavoviride*				*Metarhizium brunneum*			
		anisopliae						*majus*									
		Tü 8074 = CBS 130.71				Tü 8075 = CBS 431.64		CBS 289.67		Tü 8076 = CBS 148.64		CBS 473.73		CBS 218.56		CBS 316.51	
Kulturmedium	(A) (B) (C) (D)	(A) (B) (C) (D)				(A) (B) (C) (D)		(A) (B) (C) (D)		(A) (B) (C) (D)		(A) (B) (C) (D)		(A) (B) (C) (D)		(A) (B) (C) (D)	
ATCC 6051 *Bacillus subtilis*	- ⊕ - -	+ ⊕ - -				⊕ + + -		+ - - +		+ + - -		⊕ - - -		- - - -		+ + - -	
Tü 57 *Streptomyces viridochromogenes*	- ⊕ - -	- - - -				⊕ ⊕ ⊕ -		+ - - -		⊕ - - -		+ + + -		- - - -		+ + - -	
Tü 284 *Rhizomucor miehei*	- + - -	- + - -				- - - -		- - - -		- - - -		⊕ ⊕ + -		- - - -		- - - -	
Tü 169 *Alternaria kikuchiana*	- - - -	+ + ⊕ +				⊕ + + -		- + - -		- + - -		+ + + ⊕		- - - -		- ⊕ + +	
Tü 137 *Paecilomyces variotii*	- ⊕ - -	- + + -				- - - -		- - - -		- - - -		- - - -		- - - -		- - - -	
Tü 125 *Saccharomyces cerevisiae* auf Malzagar	- ⊕ + ⊕	- + + -				- - - -		- - - -		- - ⊕ -		- - - -		- - - -		- + - -	
Tü 125 auf Yeast Nitrogen Base Agar	⊕ ⊕ ⊕ ⊕	- + + -				- - - +		- - - -		- ⊕ ⊕ -		- ⊕ - -		- - - -		- - - -	

3.2. Herstellung von Metarhizin

3.2.1. Fermentation

3.2.1.1. Optimierung

Um eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, wurde eine Anzahl Nährlösungen hinsichtlich der Bildung von Metarhizin untersucht. Als bestes Produktionsmedium erwies sich Sojamedium mit 5 g Ammoniumnitrat pro Liter (SM_5).
Die Qualität des Impfmaterials war für die Metarhizinproduktion nicht entscheidend. Mit vegetativen Myzelteilen, Konidien von fünf oder 14 Tage alten Kulturen beimpfte Flüssigmedien ergaben nach gleichen Inkubationszeiten etwa gleich hohe Aktivität in den Kulturfiltraten.

3.2.1.2. Fermentation in Schüttelkulturen

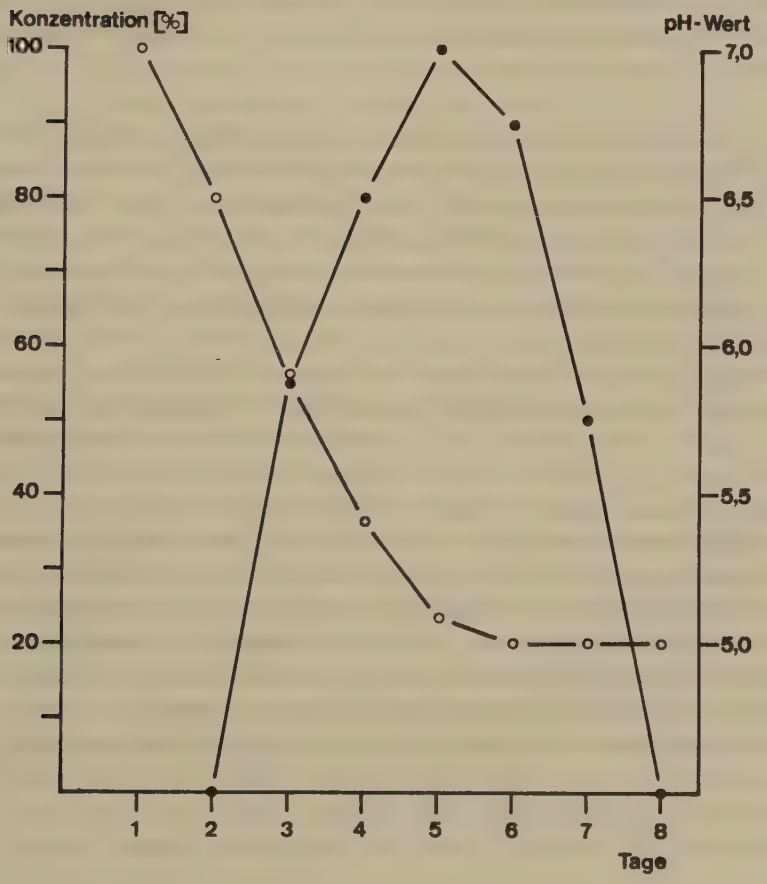
Im üblichen Produktionsmedium (SM_5) war während der ersten beiden Inkubationstage keine antibiotische Aktivität feststellbar. Diese setzte erst am dritten Tage ein und erreichte am fünften Tage ihren Höhepunkt. Nach acht Inkubationstagen war keine Aktivität mehr nachweisbar. Der pH-Wert sank in den ersten vier Tagen von pH 7 auf pH 5 und änderte sich im weiteren Verlauf der Fermentation nicht mehr (Abb.5).
In den meisten Fällen wurden vom dritten Tage an rote Pigmente gebildet. Zwischen Farbstoff- und Antibiotikabildung konnte kein Zusammenhang ermittelt werden.

3.2.1.3. Anreicherung

Nach vielen Vorversuchen zur Anreicherung des Antibiotikums, von denen sich die meisten als ungeeignet erwiesen hatten (vgl. Tab.8 S. 42), bewährte sich schließlich der im folgenden skizzierte Aufarbeitungsgang, der in Tabelle 7 schematisch zusammengestellt ist. In dessen Verlauf konnten an definierten Stellen Zwischenpräparate (Präparate A bis E)

Abb. 5 *Metarhizium anisopliae* Tü 648, Fermentationsverlauf in Schüttelkulturen. Inkubationsbedingungen: SM_5-Medium, 27°C, 120 rpm

Zeichenerklärung: • —— • Metarhizin-Konzentration
o —— o pH-Wert



zur quantitativen Kontrolle von Ausbeute und Reinheit abgezweigt werden. Als "Präparate" dienten zur Trockne eingeengte, meist lyophilisierte Aliquote der jeweiligen Gesamtlösung. Sie wurden zur Aktivitäts- und Gewichtsbestimmung verwendet. Manche Präparationen verloren einen Teil ihrer antibiotischen Aktivität beim Trocknen; in diesen Fällen wurden die Antibiotikatests mit den Ausgangslösungen durchgeführt und die Trocknung und Wägung der Präparate erst danach vorgenommen. Im Exsikkator trat beispielsweise bei Aufbewahrung über Phosphorpentoxid im Vakuum vollständige Inaktivierung ein, wogegen über Blaugel keine oder nur geringe Aktivitätsverluste festzustellen waren.

Zum Ernten wird das antibiotisch aktive Kulturfiltrat, das die Gesamtaktivität der Kultur repräsentiert, durch Filtration über Celite vom inaktiven Myzel getrennt. Nach dem Waschen des Myzels mit 200 ml E-Wasser pro Liter Kultur werden Kulturfiltrat und Waschwasser vereinigt (wäßrige Phase, Präparat A; Metarhizingehalt nach biologischer Bestimmung 4.1 g/l).

Aus der wäßrigen Phase läßt sich die aktive Fraktion an den Cellulose-Ionenaustauscher Whatman DE-23 binden. Dazu werden je Liter Kulturfiltrat 20 g Ionenaustauscher (Trockengewicht) eingesetzt. 0.4 M wäßrige Ammoniumacetatlösung wird mit Essigsäure auf pH 6.0 gebracht. Damit wird der beladene Ionenaustauscher in Portionen, die je einem Liter wäßriger Phase entsprechen, mit 2 l je Portion unter jeweils viertelstündigem Rühren (Heidolph-Laborrührer Type RZR) eluiert. Aktivitätstests sind in dieser Phase der Aufarbeitung wenig sinnvoll, weil die Hemmwirkung des Metarhizins auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 durch Ammoniumionen vollständig - wenn auch reversibel - aufgehoben wird. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeengt. Mit Alkohol läßt sich dann ein antibiotisch aktiver Niederschlag ausfällen, wozu das dreifache Volumen an ver-

gälltem 99.9%igem Ethanol eingesetzt wird. Der Niederschlag wird abfiltriert und zur Entfernung von möglichst viel Ammoniumacetat mehrmals mit Ethanol gewaschen (Präparat B, Aktivitätsausbeute 50% der wäßrigen Phase).

Das Präzipitat wird in 70%igem Ethanol gelöst. Die Lösung wird durch Filtration von unlöslichen inaktiven Begleitstoffen befreit, und das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeengt. Es bleibt eine praktisch wäßrige Lösung zurück. Danach wird die Aktivität an den Ionenaustauscher Amberlite IRA-904 adsorbiert, der mit 1 M Natriumacetatlösung in die Acetatform gebracht worden war. Die anschließende Elution erfolgt wieder portionsweise, und zwar mit 1.0 M essigsaurer, wäßriger Ammoniumacetatlösung pH 6.0. Man engt das Eluat auf ein Zehntel ein und fällt mit Ethanol ein aktives Präzipitat aus, das wiederum durch mehrmaliges Waschen mit Ethanol weitgehend von Ammoniumacetat befreit wird (Präparat C, Ausbeute lt. Tab.7 nur 16% von Präparat B, was zusammen mit der"negativen" Anreicherung auf noch vorhandene Ammoniumionen deutet. Tatsächlich steigt gemäß biologischer Bestimmung der Metarhizingehalt im folgenden Aufarbeitungsschritt wieder an, was aber nur bedeutet, daß dann die Antagonisten entfernt wurden).

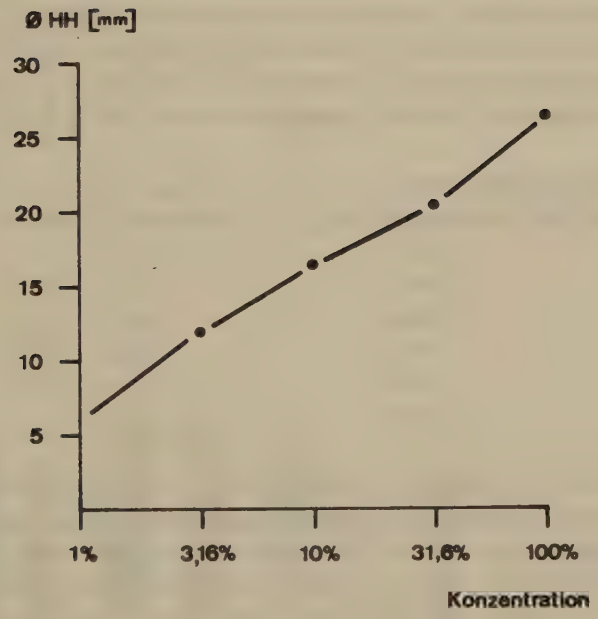
Nach Kontakt mit Servachrome XAD-7 (2 g trockenes Harz je ml) bleibt die Aktivität im Überstand, der zur Trockne eingeengt und zur Beseitigung von Ammoniumacetat und Essigsäure mit etwas Ethanol gewaschen wird. Man nimmt ihn in wenig Wasser auf, engt wieder ein und wiederholt das Verfahren mehrmals, bis alle Elutionsmittelreste so weitgehend wie möglich verschwunden sind. Das Produkt wird in Wasser gelöst, bei $-22^{o}C$ eingefroren und lyophilisiert (Präparat D, Ausbeute 22% von Präparat B).

Tabelle 7 Schema der Metarhizin-Aufarbeitung aus 5 l Kulturfiltrat.
Produzent: *Metarhizium anisopliae* Tü 648
Bedingungen: Schüttelkultur 120 rpm, 27°C, 5 d, Medium SM_5

Aufarbeitungsschritt	Trockengewicht [mg]	Spezifische Aktivität	Metarhizingehalt [mg]*	Anreicherungsfaktor	Ausbeute**	
					S[%]	A[%]
Kulturfiltrat, über 2% Celite filtriert (Präp. A)	65 500	0.03	2050	-	100	100
Adsorption an Whatman DE 23, Elution mit Ammoniumacetat 0.4 M pH 6.0, Einengen im Vakuum, Fällung mit EtOH, Waschen des Präzipitats mit EtOH (Präp. B = gewaschener Niederschlag	1 050	0.98	1025	30	50	50
Lösen in EtOH 70%, Filtration=Beseitigung inaktiver Rückstände, Einengen im Vakuum, Adsorption an Amberlite IRA-904 Acetatform, Elution mit Ammoniumacetat 1.0 M pH 6.0, Einengen, Fällung mit EtOH (Präp. C = gewaschener Niederschlag)	448	0.37	164	0.37	16	8
Lösen in EtOH 70%, Filtration=Beseitigung inaktiver Rückstände, Einengen, Adsorption von Verunreinigungen an XAD-7, Einengen des Durchlaufs, Lyophilisieren (Präp. D = Lyophilisat)	220	1.0	220	2.7	134	11

Zeichenerklärung: *: gemäß biologischer Bestimmung
**: Ausbeute S = auf den vorhergehenden Aufarbeitungsschritt bezogen; Ausbeute A = Ausbeute bezogen auf Präparat A

Abb. 6: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Metarhizinkonzentration (halblogarithmische Darstellung). 100% entsprechen 10 µg von Präparat D. Testanordnung: Agardiffusionstest/Vier-Punkte-Test (Zähner u. Maas 1972). Testorganismus: *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125. Testmedium: YNBA, 24 h, 27°C.



Den folgenden Reinigungsschritt überstehen nur ganz geringe Anteile des Metarhizins. Wäßrige Lösung von Präparat D (40 mg/2 ml) wird mit Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) weitergereinigt. Dafür wird eine Shandon ODS 16 mm Nr. 5111-Säule eingesetzt. Man eluiert mit einem Gradienten von 100% 0.5%iger Essigsäure zu 100% Acetonitril (vgl. 3.2.3.).

3.2.2. HPLC-Trennungen

Trennung über Shandon ODS 16 mm Nr. 5111

Vom lyophilisierten Präparat D wurden 40 mg in 2 ml E-Wasser gelöst und über eine Shandon ODS 16 mm Nr. 5111-Säule (reversed phase) 18 Minuten lang mit einem Gradienten von 100% 0.1%iger Essigsäure zu 100% Acetonitril eluiert. Die Durchflußrate betrug 20 ml/min, detektiert wurde bei 272 nm.

Parameter des Gradienten:

Zeit [min]	0.1%ige Essigsäure [%]	Acetonitril [%]
0.0	100.0	0.0
2.0	100.0	0.0
5.0	80.0	20.0
12.0	0.0	100.0
13.0	100.0	0.0
18.0	100.0	0.0

In Abb.7 ist der Verlauf einer typischen Elution aufgezeichnet. Darunter befinden sich Abbildungen von Chromatogrammen der entsprechenden Fraktionen (Abb.8). Es wurde eine DC-Alufolie mit Kieselgel 60 F_{254} verwendet. Fließmittel: Ethanol/Wasser = 7/3. Die Substanzflecken wurden mit Ninhydrin-Sprühreagenz sichtbar gemacht.

Eine befriedigende Trennung war nicht zu erzielen. Es entstanden, übereinstimmend mit den meisten Reinigungsversuchen

Abb. 7 Verlauf einer HPLC-Trennung über Shandon ODS 16 mm Nr. 5111. Parameter s. 3.2.3.

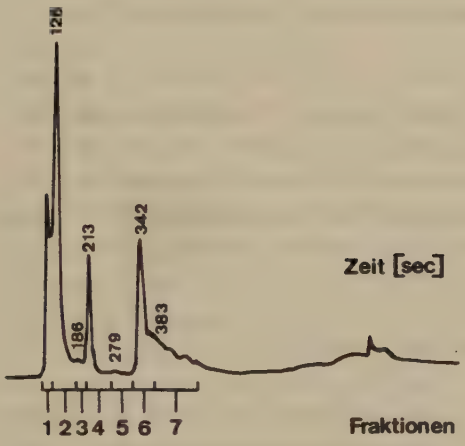
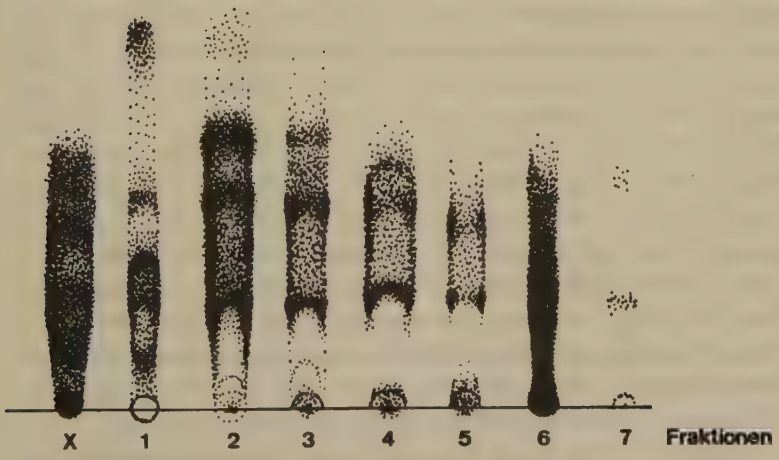


Abb. 8 Chromatogramme der einzelnen HPLC-Fraktionen. Chromatographiesystem und Detektion unter 3.2.3.



im Säulenverfahren, Zersetzungsprodukte, wie ein Vergleich des Chromatogramms von Präparat D (auf der Abbildung mit X gekennzeichnet) mit den Chromatogrammen der einzelnen Fraktionen zeigt. Dabei traten Gewichtsverluste um 50% auf.

In den Fraktionen 2 und 3 wurde die meiste Aktivität gefunden. Es wurde der Versuch unternommen, diese Fraktionen von mehreren Läufen nach Vereinigung und Lyophilisation erneut über HPLC zu reinigen. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktionen zeigt jedoch, daß sich wieder Zersetzungsprodukte gebildet hatten. Die Aktivitätsverluste betrugen um 30%.

Trennung über Polygosil NH_2 Nr. 8189

40 mg des lyophilisierten Präparats D wurden in 2 ml E-Wasser gelöst und mit einem Gradienten von 95% Acetonitril zu 100% 0.1%iger Essigsäure über die oben angeführte Säule 18 Minuten lang chromatographiert. Durchflußrate: 20 ml/min, Detektion bei 272 mn.

Parameter des Gradienten:

Zeit [min]	0.1%ige Essigsäure [%]	Acetonitril [%]
0.0	5.0	95.0
10.0	100.0	0.0
11.0	5.0	95.0
18.0	5.0	95.0

Es zeigte sich, daß Metarhizin und seine Begleitmetabolite eine sehr starke Affinität zu diesem Säulenmaterial aufweisen. Nur 10% der eingesetzten Substanzmenge wurden während des Laufs eluiert. Die übrigen 90% waren so fest ans Säulenmaterial gebunden, daß nach jedem Lauf zur Reinigung der Säule mehrere "Leergradienten" gefahren werden mußten.
Da im Verhältnis zur Ausbeute zuviel Material eingesetzt

werden müßte, wurden keine weiteren Reinigungsversuche über Polygosil-NH_2 ausgeführt.

3.3. Physikalische und chemische Eigenschaften des Metarhizins

3.3.1. Löslichkeit

Metarhizin ist gut löslich in Wasser und Pyridin und schwer löslich in Dimethylsulfoxid. In Methanol lösen sich nur Spuren des Antibiotikums, das in weniger polaren Lösungsmitteln praktisch unlöslich ist. Die bei Raumtemperatur in Ethanol, Butanol, Essigsäureethylester, Chloroform, Petroleumbenzin und Diethylether erreichbaren Konzentrationen genügen nicht, um *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 im Agardiffusionstest zu hemmen; sie dürften unterhalb von 3 µg/ml liegen (Untergrenze der Nachweisbarkeit vgl. Abb.6).

3.3.2. Stabilität

Die Stabilität des Metarhizins läßt sich nach seiner antibiotischen Aktivität gut beurteilen. "Irreversible Inaktivierung" ist nach den vorliegenden Beobachtungen gleichbedeutend mit dem Metarhizin-Abbau, der in Dünnschichtchromatogrammen dadurch zum Ausdruck kommt, daß mit der Verkleinerung bzw. mit dem Verschwinden des Metarhizinflecks zwei Typen neuer, ebenfalls mit Ninhydrin anfärbbarer Flecken auftreten: einer, der am Startpunkt bleibt bzw. mit den benutzten Laufmitteln nicht wandert, und eine Reihe von fünf sehr verschmierten Hauptflecken mit R_f-Werten von ca. 0.1, 0.2, 0.4, 0.7 und 0.9.
Diese Flecken treten auch bei Chromatogrammen des Kulturfiltrats auf. Sie müssen nach den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls als Abbauprodukte interpretiert werden.
Bei Antagonisierung von Metarhizin durch Aminosäuren und

Tabelle 8 Aufarbeitungsversuche mit verschiedenen Anreicherungsmethoden und deren Verwendbarkeit zur Isolierung von Metarhizin

Methode	Vorteile	Nachteile	Anwendung
1. Extraktion inaktiver Metabolite aus angesäuertem Kulturfiltrat mit BuOH, EE, Chloroform, Diethylether	Kein Aktivitätsverlust	Nur wenige Verunreinigungen abgetrennt	
2. Gegenstromverteilung nach Craig mit BuOH/DMSO/H_2O 10/2/8 BuOH/DMSO/H_2O/Essigsäure 10/8/11/1 BuOH/EE/H_2O/MeOH 9/1/9/1 BuOH/Essigsäure 4/1, equilibriert	Kein Aktivitätsverlust	Nur wenige Verunreinigungen mit sehr großem Aufwand abtrennbar	
3. Fällung mit Ethanol aus konzentrierter wäßriger Lösung	Entfernung von Begleitstoffen u. Ammoniumacetat	Keine Fraktionierung möglich, hohe verluste bei mehrfachem Umfällen	Als Zwischenstufe vor Präp. B u. C
4. Gelfiltration (Säulenverfahren): (1) LH-20 mit 50% MeOH, 70% EtOH, (2) A-50, G-25, G-50, G-100 mit H_2O, 50% MeOH, 70% EtOH, 0.5% Essigsäure, 0.1 M Ammoniumacetat, (3) Biogel P-2 mit 50% MeOH, 70% EtOH, 0.5% Essigsäure, 0.1 M Ammoniumacetat	Kein oder geringer Aktivitätsverlust	Keine gute Trennung, keine Entsalzung, Kapazität der Gele gering	
5. Verteilungschromatographie (Säulenverfahren): (1) Cellulose mit H_2O, 70% EtOH, (2) RP-8 mit H_2O, 50% MeOH, 50% Acetonitril		Teilweise Inaktivierung, keine Trennung	
(3) Kieselgel 60 mit 70% EtOH		Fast vollständige Inaktivierung	
(4) Al_2O_3 mit 70% EtOH		100% Inaktivierung	
6. Präparative Schichtchromatographie an Cellulose bzw. Kieselgel 60, Fließmittel EtOH/H_2O 7/3		Inaktivierung, Entstehung von Zerfallsprodukten	
7. Adsorption im Batch-Verfahren an: (1) Aktivkohle		Inaktivierung oder irreversible Adsorption	
(2) XAD-2, XAD-4 in verschiedenen pH-Bereichen		Weder Metarhizin noch inaktive Metabolite adsorbiert	

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Methode	Vorteile	Nachteile	Anwendung
(3) XAD-7	Abtrennung von Begleitstoffen	Erst nach Vorreinigung anwendbar	Für Präp. D
8. Anionenaustauscher im Säulenverfahren		Verluste bis 100%	
9. Anionenaustauscher im Batchverfahren	Geringe Verweilzeiten, Abtrennung von Begleitstoffen	Keine Fraktionierung möglich Geringe Ausbeute (50%)	Für Präp. B und C als 1. Anreicherungsschritt
(1) Cellulose-Anionenaustauscher DE-23, Elution mit 0.4 M Ammoniumacetat pH 6.0			
(2) Anionenaustauscher Dowex 1x8 Cl, Elution mit 0.4 M NaCl, pH 5.0 mit HCl eingestellt	Abtrennung von Begleitstoffen	Elutionsmittel nicht durch EtOH-fällung abtrennbar	
10. Isotachophorese (Prof. Dr. H. Kneifel KFA Jülich Institut für Biotechnologie)		Metarhizin nicht mehr nachweisbar	
11. Papierelektrophorese mit Citrat-HCl-Puffer pH 3.0-4.8 und Phosphatpuffer pH 4.6-7.0	Aktivität erhalten	Kaum Abtrennung von inaktiven Metaboliten	nur analytisch
12. HPLC			
(1) Polygosil-NH_2-Säule, Elution mit Gradient von Acetonitril zu 0.1% Essigsäure		Teilweise Inaktivierung, irreversible Bindung von Metarhizin an Säulenmaterial Aktivitätsverlust um 50%, Vorreinigung unerläßlich	
(2) Shandon ODS 16 mm Nr. 5111 (reversed phase), Elution mit Gradient von 0.1% Essigsäure zu Acetonitril	Anreicherung		

aminosäurenhaltigen Substanzen zeigt sich im Dünnschichtchromatogramm nur der immobile Fleck am Startpunkt (vgl. 3.4.3.).

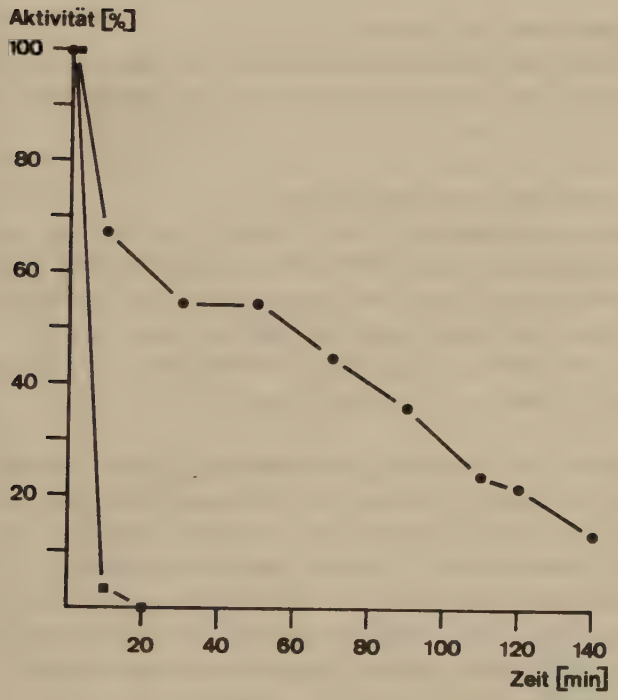
Temperaturstabilität
Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, daß nach 20 Minuten bei 100°C keine antibiotische Aktivität mehr nachzuweisen war, während bei 80°C das Metarhizin nach 140 Minuten zur Hälfte inaktiviert war.
Alle Metarhizin-Präparate lassen sich in wäßriger Lösung und als Lyophilisate bei -22°C monatelang ohne meßbaren Aktivitätsverlust aufbewahren. Voll erhalten blieb die Aktivität der Präparate B, C und D mindestens 30 Tage lang auch bei +2°C bis +4°C. Bei Raumtemperatur wird der Wirkstoff in allen geprüften Aufbewahrungsformen innerhalb von fünf Tagen inaktiviert.

Stabilität gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration
Metarhizin ist hauptsächlich in dem engen Bereich zwischen pH 4 und pH 6 antibiotisch aktiv. Im alkalischen Bereich ab pH 7 geht die antibiotische Aktivität verloren. Zwischen pH 3.8 und 6.8 werden alle Präparate in wäßriger Lösung bei Raumtemperatur innerhalb von fünf Tagen völlig inaktiviert.

Tabelle 9 Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die antibiotische Wirkung von Präp. D (1 mg/ml)

pH-Wert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hemmhof-durchmesser [mm]	-	9	20	25	32	30	-	-	-	-
Aktivität [%]	-	0.8	6.5	25	100	70	-	-	-	-

Abb.9 Inaktivierung von Metarhizin durch Hitzeeinwirkung



Zeichenerklärung: ●——● bei 80°C
■——■ bei 100°C

Stabilität gegenüber ultravioletter Strahlung
Die antibiotische Aktivität von Metarhizin wird durch Einwirkung von ultraviolettem Licht nicht beeinträchtigt. Auch nach einstündiger Bestrahlung war keine Aktivitätsminderung feststellbar.

Stabilität gegenüber Oxidation
Auch nach 24stündiger Einwirkung von H_2O_2 bei Raumtemperatur verringerte sich die antibiotische Aktivität von Metarhizin nicht.

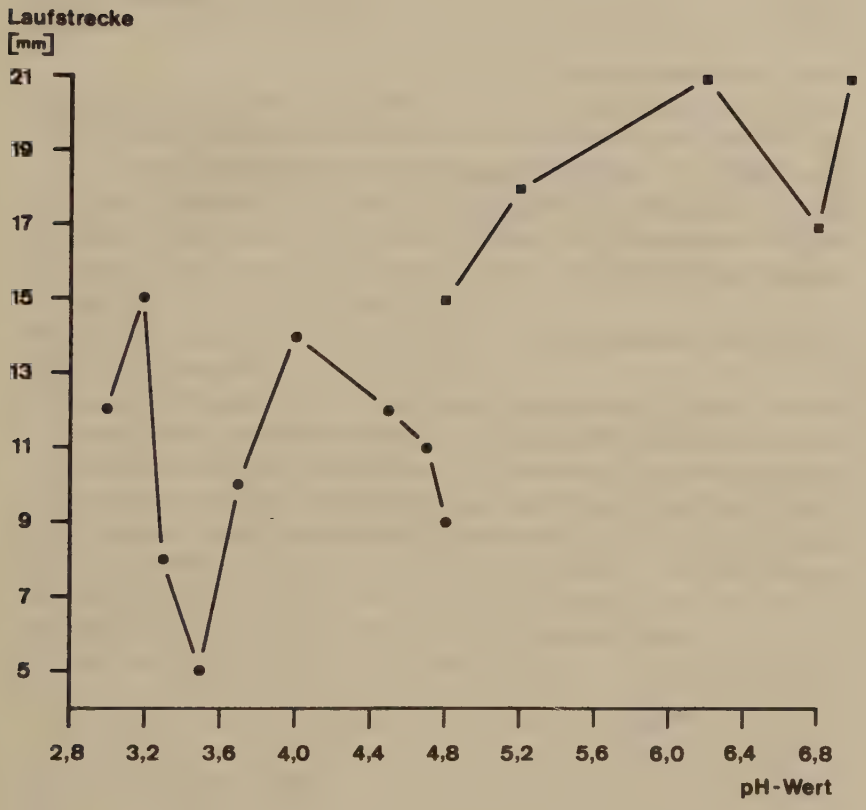
Stabilität gegenüber weiteren Faktoren
Beim Umfällen der Präparate B und C gingen ca. 30% des Metarhizins in alkohollösliche, inaktive Zerfallsprodukte über. Ebenfalls 30% Aktivitätsverlust ergaben sich bei dem Versuch, Metarhizin über eine Kieselgel-60-Säule zu reinigen. Die verbliebenen 70% waren, in wäßriger Lösung bei $-22^{\circ}C$ eingefroren, nach 5 Tagen antibiotisch inaktiv.

Die Instabilität des Metarhizins zeigte sich unter anderem bei längerem Kontakt mit großen Oberflächen. Adsorbentien konnten fast nur im Batch-Verfahren eingesetzt werden, denn bei längerer Verweildauer an diesen Materialien besteht die Gefahr der völligen Inaktivierung. Beispielsweise führte der Versuch, Metarhizin über Ionenaustauscher im Säulenverfahren zu reinigen, zur Zerstörung der antibiotischen Aktivität (vgl. auch HPLC-Trennungen 3.2.4. u. Abb.7 u. 8).

3.3.3. Nachweisversuche mit verschiedenen Reagenzien

Dünnschichtchromatogramme von Metarhizin wurden mit verschiedenen Sprühreagenzien behandelt. Es zeigte sich keine Reaktion mit Anilinphtalat, Anisaldehyd, Bromkresolgrün, Dichlorindophenol, Ehrlichs Reagenz, Molybdatophosphorsäure, 1 N NaOH + 75% Methanol, Rhodamin B, Tetrazoliumblau.

Abb.10 Elektrophorese



Zeichenerklärung: ● —— ● mit Citrat-HCl-Puffer

■ —— ■ mit Phosphatpuffer

Farbreaktionen, die dem R_f-Wert nach mit der Zone der antibiotischen Aktivität identisch sind, wurden mit TDM-Reagenz (blaugrüner Fleck), Ninhydrin Sprühreagenz (rotvioletter Fleck) und Vanillin-Schwefelsäure (schwarzbrauner Fleck) erzielt.

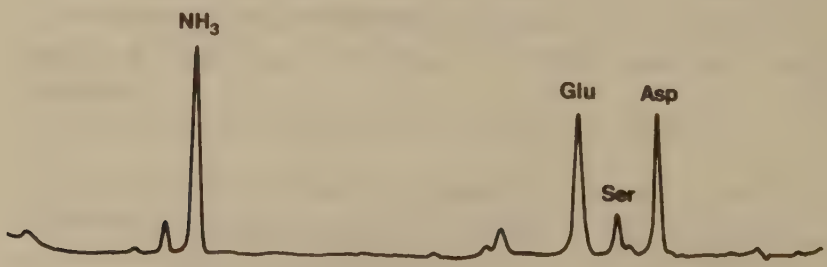
3.3.4. Elektrophorese

Aus Abb.10 ist ersichtlich. daß die Aktivität zur Anode wandert. Inaktive Begleitmetabolite wurden nicht abgetrennt. Die antibiotische Aktivität blieb erhalten und wurde im Agardiffusionstest und durch Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühreagenz nachgewiesen.

3.3.5. Aminosäurenanalyse

Mit den vereinigten Fraktionen 2 und 3 der HPLC-Trennung über die Shandon ODS 16 mm Nr. 5111-Säule wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Sie ergab 3 Glutaminsäurereste, 2 Asparaginsäurereste und einen Serinrest. Der hohe NH_3-Anteil wird auf nicht vollständig entferntes Ammoniumacetat zurückgeführt.

Abb.11 Aminosäurenanalyse



3.3.6. Dünnschichtchromatographische Charakteristika

Die R_f-Werte des Metarhizins bei Chromatographie mit verschiedenen Laufmitteln sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Chromatographiert wurde an Kieselgel 60-Alufolien F_{254}.

Tabelle 10 R_f-Werte des Metarhizins in Dünnschichtchromatogrammen mit Kieselgel 60 und verschiedenen Laufmitteln

Laufmittel	R_f-Werte
Ethanol : 0.1 M Essigsäure 7 : 3	0.5
Ethanol : Wasser 7 : 3	0.6
Methanol : Wasser 3 : 1	0.7
Methanol : Wasser 1 : 1	0.8

Identifikation des Metarhizins in Dünnschichtchromatogrammen:

1) Bioautographie (Zähner u. Maas 1972); Testkeim Tü 125
2) Löschung der Fluoreszenz im langwelligen UV-Licht (366 nm)
3) Ninhydrin-Reaktion: rotvioletter Fleck
4) TDM-Reaktion: blaugrüner Fleck

3.4. Biologische Eigenschaften des Metarhizins

3.4.1. Wirkung gegen Pilze

Die Empfindlichkeit verschiedener Hefen und Fadenpilze wurde im Strichtest untersucht.

Tabelle 11 Wirkung von Metarhizin gegen Pilze

Stamm-Nr.	Name	Medium	Hemmung
Tü 125	*Saccharomyces cerevisiae* Hansen	YNBA,MA	++,+
Tü 539	*Saccharomyces cerevisiae* Hansen Stamm Neuberg CBS 1256	MA	-
Tü 577	*Saccharomyces cerevisiae* Hansen Stamm E 237 Universität Stuttgart-Hohenheim Paarungstyp α	MA	+
Tü 579	*Saccharomyces cerevisiae* Hansen Stamm A 21 Institut für Gärungsforschung Berlin Paarungstyp a	MA	+
Tü 8013	*Hansenula wingei* Wickerham DSM 70281	MA	-
Tü 561	*Nadsonia fulvescens* (Nadson et Konokotina) Sydow CBS 2596 (Typus)	MA	-
Tü 291	*Pichia farinosa* Lindner (Hansen)	MA	-
Tü 193	*Endomycopsis fibuligera* (Lindner) Dekker ATCC 9947	MA	-
Tü 565	*Candida albicans* (Robin) Bekhout CBS 562 (Typus)	MA	-
Tü 8053	*Candida guilliermondii* (Castellani) Langerson	MA	-
Tü 8054	*Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout CBS 94 (Typus)	MA	-
Tü 567	*Ustilago maydis* (Beckmann) Unger CBS 445.63	MA	-
Tü 282	*Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigoriakis ATCC 42899	MA	+

Tü 567	*Epidermomyces floccosus* (Harz) Loeffler CBS 240.67	MA	-
	Fusarium dimerum Penz. var. *nectrioides*	MA	+

Zeichenerklärung:
- \- keine Hemmung
- \+ Hemmhofdurchmesser bis 10 mm
- ++ Hemmhofdurchmesser über 10 mm

3.4.2. Morphologische Veränderungen an *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125

Beim Agardiffusionstest von Metarhizin gegen *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125 (auf YNBA, 27°C, 24 h) treten Wachstumshemmung und morphologische Veränderungen am Testorganismus auf. Die Zellsprossung findet hauptsächlich am apikalen Pol statt. Es entstehen Sproßzellen, die in der Längsachse gestreckt sind, verdickte Wände ausbilden und stark vakuolisiert erscheinen (Abb. 3 und 4).

3.4.3. Antagonismus

Metarhizin wird - außer durch Glycin und Lysin - von allen getesteten Aminosäuren antagonisiert.
Die Wirkung von 10 µg Metarhizin (Präp. D) wird durch 0.5µMol Isoleucin, 1 µMol Phenylalanin, 1.5 µMol Cystein und Leucin, 2 µMol Glutaminsäure und Methionin und durch mehr als 2 µMol Asparaginsäure, Asparagin, Allothreonin, Glutamin, Prolin, Serin, Tryptophan und Tyrosin aufgehoben. Ammoniumacetat wirkte in einer Dosierung von 10 µg vollständig antagonisierend, während bei Casamino Acids, Hefeextrakt, Pepton aus Casein und Proteose Pepton dazu je 40 µg nötig waren.

Im Kreuztest zeigt sich das Bild der kompetitiven Hemmung.

3.4.3.1. Reversibilität der antagonistischen Wirkung

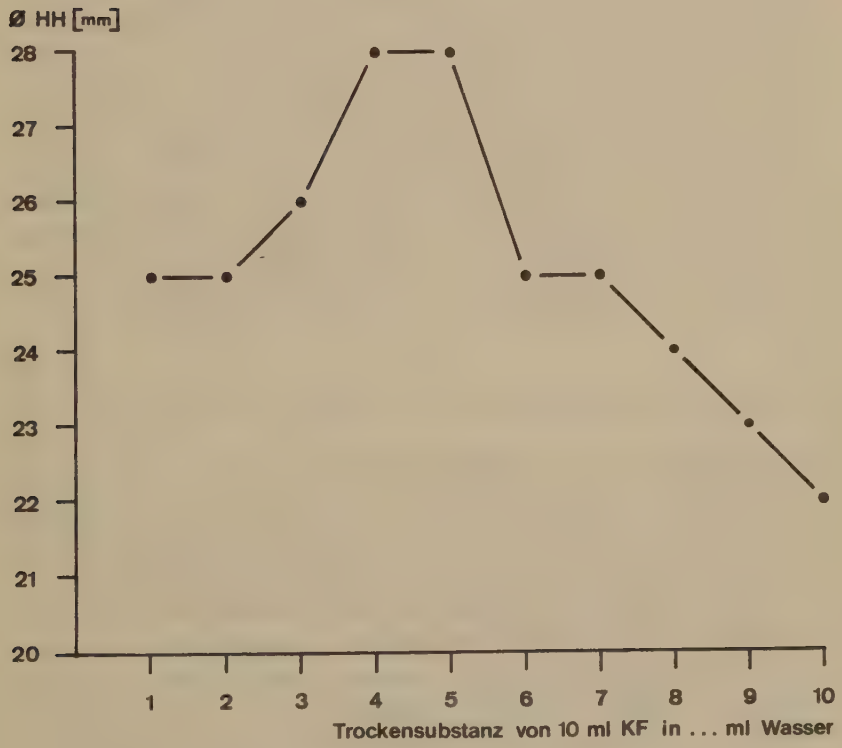
Es war versucht worden, Gemische aus Metarhizin und antagonisierenden Substanzen dünnschichtchromatographisch zu trennen. (Durchführung unter 2.6.5.1.)
Nur bei dem Fleck von Präparat D, der mit Ammoniumacetatlösung behandelt worden war, konnte eine Trennung auf der Dünnschicht festgestellt werden. Der größte Teil der Inhaltsstoffe bildete einen Fleck mit dem R_f-Wert 0.8, gefolgt von Ammoniumacetat mit dem R_f-Wert 0.7-0.8. Darunter lag eine sehr schwach sichtbare Schmierspur, die von einem hellbräunlichen Fleck am Start ausging. Im Bioautogramm war keine antibiotische Aktivität mehr feststellbar. Diese Aufhebung ist jedoch reversibel (Aufarbeitungsgang Tab.7). Aus wäßrigen Ammoniumacetatlösungen kann Metarhizin durch Ethanol ausgefällt werden, wobei sich das Ammoniumacetat in Ethanol löst. Von geringen Verlusten abgesehen, kann die antibiotische Aktivität im Präzipitat nachgewiesen werden.
Die mit Aminosäuren und aminosäurenhaltigen Substanzen behandelten Flecken von Präparat D waren weder mit den für Metarhizin erprobten Fließmitteln noch mit Gemischen zur Untersuchung von Aminosäuren (Stahl 1967) aufzutrennen. Am Start blieb je ein brauner unbeweglicher Fleck. Im Bioautogramm war keine antibiotische Aktivität mehr feststellbar. Parallel wurden Chromatogramme der antagonisierenden Substanzen ohne Präparat D mit Fließmitteln für Aminosäuren durchgeführt. Die Komponenten ließen sich auftrennen.

3.4.3.2. Antagonisierende Begleitmetabolite

Bei der Fermentation entstehen Antagonisten, die bei Konzentrierung des Kulturfiltrats eine Aktivitätsminderung bewirken. Sie sind alkohollöslich und können so durch die Ausfällung des Metarhizins mit Ethanol abgetrennt werden.

Abbildung 12 zeigt die Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Konzentration des Kulturfiltrats bzw. der daraus durch Lyophilisieren hergestellten Trockensubstanz. Durch den Einfluß antagonisierender Begleitmetabolite wird bei hohen Konzentrationen eine Abnahme der antibiotischen Aktivität bewirkt.

Abb.12 Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Konzentration des Kulturfiltrats



4. DISKUSSION

4.1. Stammbestimmung

In der ersten Zeit nach der Isolierung des Pilzstammes Tü 648 waren dessen morphologische Merkmale noch nicht deutlich ausgebildet. Das änderte sich allmählich, vermutlich in Zusammenhang mit der durch periodisches Überimpfen von Konidien ausgeübten ständigen Selektion und durch Auswahl des für die Stammhaltung am besten geeigneten Agarmediums. Mit der Stabilisierung der Morphologie ging eine zunehmend bessere Reproduzierbarkeit der antibiotischen, im wesentlichen gegen *Saccharomyces cerevisiae* wirksamen Aktivität einher. Die nun stets typischen Konidienträger, Sporodochien und Koremien erlaubten schließlich mit anderen morphologischen Merkmalen zusammen die Bestimmung von Gattung und Art. Damit wurde aus der Untersuchung der antibiotischen Aktivität eines anonymen Pilzstammes die wesentlich konkretere Aufgabe, ein bestimmtes Stoffwechselprodukt des als insektenpathogen bekannten Hyphomyceten *Metarhizium anisopliae* zu isolieren und zu charakterisieren.

4.2. Vergleich mit bekannten *Metarhizium*-Antibiotika

Ein Vergleich mit den für *Metarhizium anisopliae* in der Literatur erwähnten Antibiotika (Tab.14) zeigte, daß keine dieser Verbindungen ähnliche Eigenschaften wie Metarhizin, das hier bearbeitete Antibiotikum, besitzt. Aminosäurenkomponenten sind jedoch häufig vertreten, und somit scheint die neue Verbindung doch in den erwarteten Rahmen zu passen. Für die übrigen *Metarhizium*-Arten sind - außer Helvolinsäure als Produkt von *Metarhizium brunneum* (Turner 1983) - keine antibiotisch aktiven Sekundärmetabolite beschrieben. Helvolinsäure ist ein Steroidantibiotikum und kann schon wegen seiner aus-

Tabelle 12 Vergleich biologisch aktiver Stoffwechselprodukte von *Metarhizium anisopliae*

Metabolit	Stoffklasse	Nachgewiesene Aminosäurereste	Aktivität gg. *Sacch. cer.*	Literaturquelle
Cytochalasin C,D	Cytochalasin	Phe	-	Binder 1973, Hayakawa 1968
Destruxin A,B, C,D	Depsipeptid	Ileu, Pro, ß-Ala, N-MeAla, N-MeVal	-	Suzuki 1971, Tamura 1975
Desmethyldestruxin B	Depsipeptid	Ileu, Pro, ß-Ala, N-MeAla, Val	keine Angaben	Tamura 1975
Helvolsäure, Helvolinsäure	Steroid	-		Turner 1983
Prolylleucylanhydrid	Aminosäurenderivat	Pro, Leu		Kodaira 1961
Prolylvalylanhydrid	Aminosäurenderivat	Pro, Val		Kodaira 1961
Protodestruxin	Depsipeptid	Ileu, Pro, Ala, ß-Ala, Val		Suzuki 1972
Metarhizin	Aminosäurenderivat	Asp, Glu, Ser	+	
K-582	Peptidantibiotikum	Arg, Thr, Hydroxy-Arg, Tyr, Orn, Lys	+	Kondo 1980

gesprochen lipophilen Eigenschaften nicht mit Metarhizin verwechselt werden.

Bei morphologisch sehr variablen Pilzarten, zu denen *Metarhizium anisopliae* zweifellos gehört, muß mit gelegentlichen Fehlbestimmungen gerechnet werden, so daß Antibiotika fälschlich anderen Taxa zugeordnet sein können. Deshalb wurde in der Literatur auch nach Stoffwechselprodukten von Organismen gesucht, die mit *Metarhizium anisopliae* verwechselt worden sein könnten (*Acremonium, Nalanthamala, Sphaerostilbe, Wallrothiella*). Das Ergebnis war negativ.

Alle erreichbaren *Metarhizium*-Stämme wurden nach Möglichkeit morphologisch und hinsichtlich ihrer antibiotischen Eigenschaften untersucht (Tab.6). Bei ihnen angetroffene antibiotische Wirkungen traten sporadisch auf oder waren schwach ausgeprägt. In keinem Fall war irgendeine Aktivität mit Metarhizin zu identifizieren.

4.3. Aufarbeitungsversuche

Metarhizin ist sehr reaktiv und entsprechend unstabil. Bis zum Ende der Arbeit konnte es nicht rein gewonnen werden. Das Hauptproblem bestand in der Vermeidung von Kontakten mit inaktivierenden Substanzen bzw. inaktivierenden Bedingungen überhaupt.
Immerhin erwies sich die Aufhebung der Metarhizin-Wirkung durch Ammoniumionen im sauren Bereich als reversibel. Somit war eine Adsorption an Ionenaustauscher wie DE-23 und IRA-904 mit nachfolgender Desorption durch Ammoniumacetat möglich. Durch die anschließende Fällung der Substanz mit Ethanol konnte das alkohollösliche Ammoniumacetat abgetrennt werden.
Doch eine längere Verweilzeit an scheinbar nicht inaktivierenden Adsorbentien kam nicht in Frage. Vor allem bei Säu-

lenchromatographie an Ionenaustauschern waren Verluste von 30 bis 50% der Aktivität feststellbar. Deshalb blieb nur die Aufarbeitung im Batch-Verfahren übrig. Hier kann die Verweilzeit am Ionenaustauscher durch unmittelbar anschließende portionsweise Elution stark abgekürzt werden. So lassen sich Aktivitätsverluste reduzieren.

Irreversible Aufhebung der antibiotischen Wirkung war in der Regel mit der Zerstörung des Metarhizin-Moleküls verbunden. Erkennbar war dies auf dem Dünnschichtchromatogramm an charakteristischen Abbauprodukten. Diese Anzeichen des Metarhizinabbaus traten insbesondere beim Chromatographieren mit Kieselgel auf. Daher konnte bei manchen Reinigungsversuchen nicht entschieden werden, ob eine gewisse Anreicherung erzielt und gleichzeitig ein erkennbarer Anteil des Metarhizins abgebaut worden war oder ob die betreffenden Versuche nicht zur Anreicherung führten. Da Metarhizin am Kieselgel der Dünnschichtplatten zerstört wird, sind andere Verfahren zur Reinheitsprüfung gesucht worden. Doch war bei Verwendung von Dünnschichtplatten mit RP-8 und Cellulose weder eine befriedigende Auftrennung von Metarhizin und Begleitmetaboliten noch die Erhaltung der antibiotischen Aktivität zu erzielen.

Irreversibel aufgehoben wurde die Aktivität des Metarhizins auch durch Alkalien, Aminosäuren und aminosäurenhaltige Substanzen. Im Dünnschichtchromatogramm erschien dann ein immobiler Fleck am Startpunkt, jedoch fehlten die als Abbauprodukte interpretierten zusätzlichen Flecken.

4.4. Die Wirkung von Metarhizin

Die Inaktivierung von Metarhizin durch Aminosäuren läßt Schlüsse auf die Wirkungsweise dieses Antibiotikums zu. Vermutlich komplexiert Metarhizin die im Medium und im Inneren der Hefezelle vorhandenen Aminosäuren und entzieht sie so

den Stoffwechselvorgängen. Der Testorganismus scheidet möglicherweise bei Anzucht auf dem aminosäurenfreien Yeast Nitrogen Base Agar verstärkt Enzyme des Aminosäurentransports ins Medium aus. Es wäre denkbar, daß sich Metarhizin an diese für *Saccharomyces cerevisiae* spezifischen Transportsysteme anlagert (Grenson 1970, 1971) und sie damit irreversibel blockiert. Das sehr enge Wirkungsspektrum von Metarhizin ließe sich aus der spezifischen Aktivität zu diesen Enzymen oder zu einem dieser Enzyme erklären.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus einer Bodenprobe wurde ein Hyphomycet - Stamm Tü 648 - isoliert und im Screening auf antibiotische Wirkung getestet. Er wurde als *Metarhizium anisopliae* bestimmt und bildet ein hydrophiles Antibiotikum, das Metarhizin genannt wurde.

Metarhizin wurde in Submerskulturen des Produzenten mit Sojamehl-Ammoniumnitratmedium gebildet und konnte durch Ionenaustauschchromatographie, Präzipitation mit Ethanol und HPLC angereichert werden.

Metarhizin wird durch Aminosäuren vermutlich unter Komplexbildung irreversibel antagonisiert. Im alkalischen Bereich wird die antibiotische Aktivität zerstört. Ammoniumionen bewirken im sauren pH-Bereich eine reversible Antagonisierung.

Die Struktur von Metarhizin konnte nicht aufgeklärt werden, da keine Reinsubstanz zur Verfügung stand. Mit hochangereichertem Metarhizin wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Sie ergab 3 Glutaminsäurereste, 2 Asparaginsäurereste und einen Serinrest (oder das Mehrfache davon) je Molekül.

Metarhizin hemmt selektiv das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* Tü 125. Die Substanz ist außerdem noch gegen andere Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* wirksam, jedoch in viel geringerem Maße. Andere Mikroorganismen wurden nicht oder nur schwach und sporadisch gehemmt.

Die Wirkung von Metarhizin auf *Saccharomyces cerevisiae* Tü Tü 125 ist mit morphologischen Veränderungen am Testorganismus verbunden. Es wurden atypisches monopolares Sprossungswachstum, Verlängerung der Zellen und Vakuolisierung des Zellinhalts beobachtet. Vermutlich bewirkt Metarhizin Störungen durch Komplexbildung mit Aminosäuren.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Anke, T., H. Diekmann 1972: Biosynthesis of sideramines in fungi. Rhodotorulic acid synthetase from extracts of *Rhodotorula glutinis*. FEBS Letters Vol. 27, No. 2, pp. 259-262

v. Arx, E., M. Faupel, M. Brugger 1976: Das 4, 4-Tetramethyldiamino-diphenylmethan Reagens (TDM). Eine Modifikation der Chlor-o-Tolidin Farbreaktion für die Dünnschichtchromatographie. J. Chromatogr. 120, pp. 224-228

Binder, M., C. Tamu 1973: Die Cytochalasane, eine neue Klasse biologisch aktiver Metabolite von Mikroorganismen. Angew. Chem. Int. Edn. 12, p. 370

Gams, W., J. Rozsypal 1973: *Metarhizium anisopliae* n. sp. isolated from insects and from soil. Act. Bot. Neerl. 22, pp. 518-521

Grenson, M., C. How, M. Crabeel 1970: Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a general amino acid permease. J. Bacteriol. 103, pp. 770-777

Grenson, M., C. Hennaut 1971: Mutation affecting activity of several distinct amino acid transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 105, pp. 477-482

Haenel, H. 1981: A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). Z. Angew. Entomol., Vol. 92, No. 1, pp. 9-18

Haenel, H. 1982: Selection of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill). Z. Angew. Entomol., Vol. 94, No. 3, pp. 237-245

Hayakawa, S., T. Matsushima, T. Kimura, H. Minato, K. Katagiri 1968: Zygosporin A, a new antibiotic from *Zygosporium masonii*. J. Antibiot. 21, p. 523

Kanauchi, H., M. Tohno, Y. Tsuchiya et al. 1983: Studies on the structure of a novel peptide antibiotic, K-582. Int. J. Peptide Protein Res., Vol. 21, No. 5, pp. 546-554

Kodaira, Y. 1961: Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraeus* and *Oospora destructor*. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 25, pp. 261-262

Kondo, S., N. Meguriya, H. Mogi, T. Aota, K.Miura, T. Fuji et al. 1980: K-582, a new peptide antibiotic. J. Antibiot. 33(6), pp. 533-542

Marschall, K. J., J. Joane 1982: The effect of re-release of *Orcytes rhinoceros* Baculovirus in the biological control of Rhinoceros beetles in Western Samoa. J. Invertebr. Pathol., Vol. 39, No. 3, pp. 267-276

Schaerfenberg, B. 1959: Zur Biologie und Ökologie des insektentötenden Pilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Entwicklung, Kultur, Lebensansprüche, Infektionsverlauf, praktische Bedeutung). Z. Angew. Entomol. 44, pp. 262-271

Shirling, E. B., D. Gottlieb 1966: Methods for characterisation of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bact., Vol. 16, No. 3, pp. 313-340

Stahl, E. 1967: Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Suzuki, A., S. Tamura 1975: Destruxins and insecticides of microbial origin. Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan *

Tamura, S., N. Takahashi 1975: Destruxins and piercidins. Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan *

---

* zitiert nach persönlicher Mitteilung von Herrn Professor S. Tamura an Herrn Professor Dr. W. Loeffler, Tokio 1975

Tulloch, M. 1976: The genus *Metarhizium*. Trans. Br. Mycol. Soc. 66(3), pp. 407-411

Turner, W. B. 1971: Fungal Metabolites. Academic Press London New York

Turner, W. B., D. C. Aldridge 1983: Fungal Metabolites II Academic Press Inc. London

Zähner, H., W. K. Maas 1972: Biology of Antibiotics. Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin

Meine akademischen Lehrer waren:

Altendorf, Bader, Bentrup, Braun, Bünning, Diekmann, Drumm, Engelmann, Gocht, Grell, Hemleben, Herm, Klee, Kretschmar, Krüger, Kulzer, Lodemann, Loeffler, Mägdefrau, Metzner, Mickoleit, Möhres, Mörike, Opitz, Pape, Riedel, Rieker, Rüdorff, E. Sander, J. Sander, Schönenberg, Schönnamsgruber, Schumann, Schwartz, Schweizer, Schwemmle, Seilacher, Seiler, Stumpp, Wendt, Wenk, Winkelmann, Winkler, Zähner, Zetsche, Zimmermann.

Lebenslauf

Name, Vornamen:	Glück, Christel Gertrud, geb. Ehmann
Geboren:	07. Juli 1948 in Reutlingen
Eltern:	Oskar Ehmann und Herta Ehmann geb. Hoßmann
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulausbildung:	
1955 bis 1959	Jos-Weiß-Volksschule Reutlingen
1959 bis 1967	Friedrich-List-Gymnasium Reutlingen
1967	Reifeprüfung
1967 bis 1968	Pädagogische Hochschule Reutlingen
1968 bis 1974	Universität Tübingen, Studienfächer Mikrobiologie, Spezielle Botanik, Parasitologie, Geologie
1974 bis 1977	Vom Studium beurlaubt
1977 bis 1979	Diplomarbeit am Institut für Biologie I unter Leitung von Prof. Dr. G. Winkelmann
1979	Biologie-Diplom
1979 bis 1984	Dissertation am Institut für Biologie II unter der Leitung von Prof. Dr. W. Loeffler